



**57. VÝROČNÍ
CYTOGENOMICKÁ
KONFERENCE**

SBORNÍK

5. – 6. ZÁŘÍ 2024
OREA CONGRESS HOTEL BRNO

MASARYKOVA
UNIVERZITA

57. Výroční cytogenomická konference

5.-6. 9. 2024 | Orea Congress Hotel Brno

SBORNÍK ABSTRAKTŮ

© 2024 Masarykova univerzita



Kniha je licencovaná pod licencí

CC BY-SA 4.0 Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International

ISBN 978-80-280-0586-3

ABSTRAKTY PŘEDNÁŠEK

Analýza a třídění mitotických chromozómů pomocí průtokové cytometrie

Jaroslav Doležel

Centrum strukturální a funkční genomiky rostlin, Ústav experimentální botaniky AV ČR

Kondenzované mitotické chromozómy jsou tradičně studovány imobilizované na vhodném podkladu pomocí světelné nebo elektronové mikroskopie. Je však také možné je analyzovat za pohybu v úzkém vodním paprsku pomocí průtokové cytometrie. Takzvaná průtoková karyotypizace klasifikuje chromozómy podle relativního obsahu DNA a přítomnosti určitých repetitivních sekvencí DNA. Tento způsob analýzy karyotypu je však méně informativní než metody molekulární cytogenetiky a genomiky a byl užitečný pouze v určitých případech. Skutečná přednost analýzy chromozómů pomocí průtokové cytometrie spočívá ve schopnosti purifikovat mitotické chromozómy tříděním pro následné analýzy. Důležité je, že morfologie tříděných chromozómů je dobře zachovaná, jejich DNA je intaktní a vhodná pro řadu aplikací. Rozdělení genomů na jednotlivé chromozómy značně zjednodušilo mapování a klonování genů a také sestavování sekvencí komplexních genomů rostlin. Schopnost purifikovat kondenzované mitotické chromozómy umožnila popsat trojrozměrné uspořádání DNA a charakterizovat jejich proteinové složení. Zkoumání purifikovaných chromozómů pomocí environmentální rastrovací elektronové mikroskopie odhalilo unikátní organizaci perichromozomální vrstvy. Analýza a třídění pomocí průtokové cytometrie tak ideálně doplňuje mikroskopická pozorování a usnadňuje studium jaderných genomů a jejich stavebních prvků – chromozómů.

Poděkování: tato práce je podpořena projektem Operačního programu Jan Amos Komenský (EFRR) „Nové poznatky pro plodiny nové generace“, reg. č. CZ.02.01.01/00/22_008/0004581.

Cytogenomika v diagnostice MDS – význam a aktuální trendy

Zuzana Zemanová

Centrum nádorové cytogenomiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky,
Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

- a. Myelodysplastické neoplasie (MDS) jsou klinicky a geneticky heterogenní skupina onemocnění hematopoetických kmenových buněk, jejichž diagnostika i léčba jsou někdy velmi obtížné. Klíčovou roli v diagnostice hraje analýza genetických změn v buňkách kostní dřeně, která přináší informace důležité pro upřesnění diagnózy a prognózy, výběr vhodné terapie a pro sledování léčebné odpovědi. Konvenční cytogenetická analýza, která umožňuje detekci širokého spektra chromosomových aberací včetně strukturních přestaveb a přináší rovněž informace o klonální heterogenitě a subklonálních změnách, zůstává zlatým standardem v diagnostice MDS. V posledních letech došlo k významnému rozvoji řady moderních cytogenomických a molekulárně genetických metod (různé modifikace FISH, MLPA, aCGH/SNP, NGS), které umožňují detekci kryptických aberací a genových mutací a které významně přispěly ke zlepšení diagnostiky a léčby MDS. I přes použití pokročilých technologií však stále zůstávají některé potenciálně klinicky významné kryptické aberace neidentifikované a genetický náleze je neúplný.
- b. Klonální chromosomové aberace se objevují u ~50% primárních a 70–90% sekundárních MDS. Nejčastěji jde o delece a monosomie. U 20% MDS se nacházejí komplexní aberace. Trisomie (kromě +8) a balancované translokace jsou méně časté. Prognóza pacientů s MDS je často úzce spojena s přítomností specifických chromosomových změn. Například pacienti s del(5q) mají lepší prognózu, zatímco aberace chromosomu 7 a komplexní karyotypy jsou spojeny se špatnou prognózou. Somatické genové mutace se vyskytují u více než 90 % případů MDS, zejména v genech souvisejících s epigenetickou regulací (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), RNA sestřihem (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*), regulací transkripce (*RUNX1*, *BCOR* a *ETV6*), přenosem signálu (*CBL*, *NRAS*, *JAK2*) a odpovědí na poškození DNA (*TP53*).

V rutinní diagnostice MDS se v současnosti klade důraz na komplexní přístup a cílenou kombinaci cytogenomických a molekulárně genetických technik. Tyto postupy, založené na kaskádovitém využití různých cytogenomických metod, jsou však časově i finančně náročné. Proto se hledají nové celogenomové přístupy, které by umožnily současnou detekci všech chromosomových aberací s vyšší citlivostí, rozlišením a efektivitou. Jednou z takových slibných technologií je optické mapování genomu (OGM), které využívá fluorescenčně značenou vysokomolekulární DNA a nanofluidní čipy. OGM umožňuje současně detekovat všechny strukturní (SV) i početní varianty (CNV) a také ztráty heterozygostnosti (cnLOH) v genomu studovaných buněk a má potenciál nahradit několik souběžně probíhajících standardních technik (karyotypování, FISH, aCGH/SNP) jedním testem a tím významně zjednodušit laboratorní postupy a zároveň snížit náklady na rutinní diagnostiku. Tato pokročilá technologie může zásadně přispět k lepšímu porozumění biologii onemocnění a přizpůsobení léčby individuálním potřebám pacientů a tím maximalizovat terapeutické účinky.

Podpořeno RVO-VFN64165.

Vzácný nález dvou klonů s delecí 5q různého rozsahu u dvou nemocných s MDS

Šárka Ransdorfová¹, Iveta Mendlíková¹, Marie Valeriánová¹, Kristina Rochlová¹, Libuše Lizcová², Lenka Pavlišťová², Karla Svobodová², Lucie Hodaňová², Johana Richterová¹, Margita Vrzáková¹, Anna Jonášová³, Marie Lauermannová¹, Jana Březinová¹ a Zuzana Zemanová²

¹ Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

² Centrum nádorové cytogenomiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK v Praze

³ I. interní klinika – klinika hematologie, VFN a 1. LF UK v Praze

Delece dlouhých ramen chromosomu 5 je nejčastější rekurentní chromosomová aberace v buňkách kostní dřeně pacientů s myelodysplastickými neopláziemi (MDS). Rozsah intersticiální delece 5q se může u jednotlivých nemocných lišit, nicméně u téhož pacienta bývají obvykle ve všech buňkách delece stejného rozsahu. V literatuře jsou popisovány dvě společné deletované oblasti (CDR): 5q31.2 a 5q32-q33. Proximální oblast 5q31.2 je spojována s vysoce rizikovými MDS a AML, zatímco distální oblast 5q32-q33 bývá asociována s izolovanou del(5q) a lepší prognózou. Vzácně byly popsány delece i mimo tyto oblasti.

V naší práci představujeme 2 případy nemocných s MDS s multilineární dysplázií (MDS-MLD, WHO 2022), u nichž jsme našly dva různé buněčné klony s odlišnými rozsahy delece dlouhých ramen chromosomu 5. Nálezy jsme ověřili pomocí dostupných cytogenomických metod I-FISH (Abbott, MetaSystems, BlueGnome, Empire Genomics/Viagene), mBAND (XCYte 5, MetaSystems) a array CGH/SNP (CytoChip Focus Hematology, Illumina nebo SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray, 4x180K, Agilent).

V prvním případě se jednalo o 68letou ženu, u které jsme prokázali jeden klon s delecí: 5q14.3 až 5q33.2, který zahrnoval i oblast 5q31 a druhý klon s menší delecí: 5q14.3 až 5q23.1, kde zůstala oblast 5q31 zachována.

V druhém případě se jednalo o 77letého muže, u kterého jsme rovněž prokázali přítomnost dvou klonů s různým rozsahem delece: první klon s větší delecí 5q14.3 až 5q31.1, která zahrnovala oblast 5q31 a druhý klon s menší delecí 5q14.3 až 5q23.3, ve které zůstala oblast 5q31 zachována.

Přítomnost dvou klonů s různým rozsahem delece 5q patří mezi velmi vzácné nálezy. U obou našich pacientů jsme detekovali jak klon s delecí 5q zahrnující pro MDS typické oblasti, tak i klon s atypickou ztrátou 5q v rozsahu 5q14.3-5q23.1/5q23.3, která se nachází mimo konvenční CDR. Ve společném úseku 5q14.3-5q23.1, který byl deletovaný v obou případech, se nachází více než 150 genů (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Mnoho z nich již bylo identifikováno jako kandidátní geny, jejichž haploinsuficience by mohla vést k maligní transformaci (například RASA1, CCNH, CHD, MAN2A1 atd.). Jedná se o geny, které se podílí na řízení buněčné proliferace a diferenciaci buňky nebo mohou ovlivnit mikroprostředí. Detailní analýza atypických nálezů u MDS je velmi důležitá, protože může přinést nový pohled na patogenezi onemocnění.

Podpořeno projekty MZČR00023736 a RVO-VFN64165.

Cytogenomická analýza genomu plasmatických buněk u pacientů s mnohočetným myelomem (MM) a klonálním ziskem delece genu TP53 v průběhu onemocnění

Nováková A.¹, Pavlišťová L.¹, Berková A.¹, Lizcová L.¹, Lhotská H.¹, Aghová T. ¹, Ticháčková V.¹, Špička I.², Straub J.², Zemanová Z.¹

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

² 1. interní klinika – klinika hematologie, VFN a 1. LF UK v Praze

Mnohočetný myelom (MM) je maligní hematologické onemocnění z B buněčné řady z terminálně diferencovaných plasmatických buněk. Prognóza pacientů s MM je ovlivněna cytogenomickým nálezem v jejich kostní dřeni. U MM se nejčastěji vyskytují translokace zahrnující IgH gen (14q32), monosomie 13/delece 13q, zisk/delece 1q21/1p32 a delece genu TP53 (17p13). Mezi vysoce rizikové aberace se řadí zejména delece genu TP53. Nález delece TP53 je asociován s kratší dobou přežití a velmi špatnou prognózou. Tato aberace bývá diagnostikována u asi 10 % nově diagnostikovaných pacientů s MM, nicméně zisk této aberace v průběhu onemocnění je velmi vzácný. Delece TP53 se může vyskytovat buď jako původně subklonální změna a v průběhu léčby může dojít k selekci a následné expanzi tohoto klonu, nebo může být její vznik vyvolán de novo v důsledku léčby.

Od roku 2005 jsme provedli cytogenomické vyšetření u 1970 MM pacientů. Celkem 292/1970 nemocných jsme vyšetřili opakovaně při diagnóze a při relapsu či progresi onemocnění. Nově získanou deleci genu TP53 v průběhu onemocnění jsme detekovali u 22/292 (7,5 %) pacientů. Nejčastější chromosomové aberace spojené s MM jsme sledovali metodou FISH na imunofluorescenčně značených plasmatických buňkách (clg-FISH) s panelem specifických DNA sond (Kreatech, MetaSystems, Abbott Vysis). Komplexní karyotypy jsme analyzovali metodou mFISH (MetaSystems). K detekci mutace genu TP53 jsme použili metodu NGS (fastGEN TP53 Cancer Kit, BioVendor).

U většiny pacientů jsme detekovali deleci TP53 až po 1. relapsu či později. Zpětně jsme potvrdili, že u třech pacientů byla tato aberace přítomna jako subklonální již v době diagnózy. Kromě delece TP53 jsme u 17 nemocných prokázali i zisk dalších vysoce rizikových aberací (např. komplexního karyotypu či zisku oblasti 1q21). Translokace IgH genu byly zjištěny pouze u tří pacientů.

Podpořeno projektem MZ ČR RVO-VFN64165.

Využití volné cirkulující DNA pro analýzu mutací u mnohočetného myelomu

Balcárková J., Navrátilová J., Grohmann J., Krhovská P., Mlynářčiková M., Látal V., Pika T., Urbánková H., Papajík T., Minařík J.

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Mnohočetný myelom (MM) je hematologická malignita plazmatických buněk (PB) charakterizovaná rekurentními cytogenetickými a molekulárními abnormalitami, mezi které také patří aktivující mutace v genech signálních drah MAPK, NFκB, v mechanismech oprav DNA a cereblonu. Nejčastěji bývají identifikovány mutace v genech *NRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *TP53* a *DIS3*, přičemž jejich incidence narůstá v průběhu onemocnění.

Standardní analýza kostní dřeně (KD) u pacientů s MM je limitovaná zastoupením nádorové populace a velmi často vyžaduje separaci plazmatických buněk (PB). Jako vhodná alternativa se jeví analýza volné cirkulující DNA (cfDNA) z periferní krve, která může odrážet mutační profil patologické populace PB.

Cílem této práce bylo analyzovat mutace ve 27 vybraných genech metodou sekvenování nové generace (NGS) ve vzorcích cfDNA a DNA izolované ze separovaných CD138+ buněk a dále nalezené mutace korelovat s výsledky metod arrayCGH a FICTION.

Celkem bylo vyšetřeno 45 pacientů s aktivním MM a 8 neléčených pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) nebo doutnajícím myelomem (SMM). Mutace alespoň v jednom vyšetřovaném genu byly nalezeny u 65 % pacientů, u většiny se jednalo o mutace ve dvou a více analyzovaných genech. U jednoho pacienta byla nalezena bíalelická inaktivace genu TP53 (mutace a delece).

Párové vzorky cfDNA a DNA z CD138+ PB byly analyzovány u 31 nemocných. U 19/31 (61 %) vzorků byly detekovány mutace v genech *NRAS*, *KRAS* a *BRAF* (VAF=9–41%). Shodné mutace jako v DNA z CD138+ PB byly nalezeny, i na úrovni cfDNA u 12/14 párových vzorků s VAF=0,1–6 %. V pěti případech byly mutace detekovány pouze ve vzorcích cfDNA. U pacientů s MGUS nebyly prokázány mutace ani v DNA z CD138+ PB ani v cfDNA. U 1/4 pacienta s SMM byla prokázána mutace v genech *N-RAS* a *TENT5C* v DNA z CD138+ PB nikoliv na úrovni cfDNA.

Cytogenetické abnormality byly nalezeny u 96 % pacientů, hyperdiploidní status byl prokázán v 51 % a nonhyperdiploidní status v 44 % případech. Mutace v analyzovaných genech byly prokázány jak v hyperdiploidní skupině, tak v nonhyperdiploidní skupině.

Kombinace cytogenomických a molekulárně biologických metod vede k přesnější identifikaci genetických změn a lepšímu prognostickému rozdělení pacientů s MM. Použití cfDNA získané z periferní krve se jeví jako vhodná alternativa k molekulární analýze DNA z KD pomocí NGS.

Práce je podporována MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892) a IGA_LF_2024_001

Využití pokročilé DNA diagnostiky pro účely precizní onkologie: srovnání zkušeností z dvou molekulárních tumor boardů

Ondřej Slabý

Laboratoř molekulární patologie, Ústav patologie, Fakultní nemocnice Brno
Centrum precizní medicíny, Fakultní nemocnice Brno

Nedávné pokroky ve výzkumu nádorových onemocnění a moderních terapií významně rozšířily možnosti léčby těchto onemocnění. Úspěchů bylo dosaženo i u těch malignit, které byly donedávna považovány za neovladatelné systémovou léčbou. Prognóza onkologických pacientů se tak zlepšuje, včetně těch s metastatickým onemocněním, a logickým cílem klinického výzkumu je transformace metastatického onemocnění ze smrtelného na chronické. Za tímto pokrokem a touto ambicí stojí vedle protinádorové imunoterapie především aplikace poznatků z molekulární patologie a jejich využití pro individualizované plánování léčby. Aplikace těchto poznatků nás přivádí od histopatologického popisu nádorů na další úroveň, která zohledňuje jejich biologické vlastnosti. Za tímto účelem využíváme moderní technologie pro komplexní genomové profilování nádorů, tedy přístup který označujeme precizní onkologie. Pro úspěšnou implementaci principů precizní onkologie do klinické praxe je nezbytná multidisciplinarita v podobě tzv. molekulárního tumor boardu (MTB); v češtině lze takovou mezioborovou komisi označit jako molekulárně-onkologická indikační komise. V této komisi jsou obvykle zastoupeny specializace jako klinický onkolog, patolog, molekulární biolog (molekulární patolog), klinický genetik a klinický farmakolog. Úkolem komise je pak na základě vyhodnocení komplexních genomických analýz najít vhodný a vysoce individualizovaný léčebný plán nad rámec standardní léčby. V našem sdělení vás seznámíme s fungováním a výsledky dvou molekulárních tumor boardů fungujících ve Fakultní nemocnici Brno, komisí pro nádory dětského věku a komisí pro nádory dospělých. Porovnáme typické charakteristiky a výsledky precizní onkologie u dětí a dospělých a poukážeme na jejich možné sekundární využití pro onkologický výzkum.

Riziková stratifikace pacientů s difúzním velkobuněčným B-lymfomem pomocí molekulárně-genetických metod

Michaela Vatolíková¹, Patrik Flodr², Vít Procházka¹, Jana Navrátilová¹, Veronika Hanáčková¹, Helena Urbánková¹, Tomáš Papajík¹

¹ Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc

² Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc

Úvod: Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) představuje heterogenní skupinu lymfomů, kterou lze dle jejich buněčného původu rozdělit do dvou podskupin – GCB (Germinal Center B-cell) a ABC (Activated B-cell), navzájem se lišících molekulární patogenezí, klinickou prezentací i prognózou. V nové revizi WHO klasifikace lymfoidních neoplazií z roku 2022 byla vyčleněna skupina difúzních velkobuněčných B-lymfomů/high-grade B-lymfomů s přestavbou genů *MYC* a *BCL2*, která představuje přibližně 8 % DLBCL případů a je charakteristická agresivním klinickým průběhem a selháváním standardní léčby. Přesná identifikace molekulárních subtypů a přestaveb genů *MYC* a *BCL2* nabývá na významu především s vývojem nových terapií, které mají selektivní biologickou aktivitu v jednotlivých podskupinách.

Cíl: Retrospektivní vyšetření genové exprese s použitím Lymph2Cx testu a zhodnocení přestaveb genů *MYC* a *BCL2* u pacientů s DLBCL.

Materiál&metody: Archivní biopsie (formalínem fixované tkáně zalité do parafínu) 42 pacientů s DLBCL (39 de novo, 2 relaps, 1 progresse) diagnostikovaných a léčených antracyklinovými režimy v letech 2016–2024 byly použity jak k extrakci RNA, tak pro vyšetření pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace se sondami SPEC *MYC* DC BA a SPEC *BCL2* DC BA (Zytovision). Profilování genové exprese vybraných 20 genů bylo provedeno s využitím přístroje nCounter@Sprint (nanoString). Data byla analyzována pomocí softwaru nSolver a molekulární subtypy byly určeny testem Lymph2Cx (Scott et al., 2014).

Výsledek: S využitím Lymph2Cx testu jsme identifikovali 11 případů ABC, 24 GCB a 7 neklasifikovaných DLBCL. Pacienti v ABC skupině měli signifikantně horší přežití bez progresse i celkové přežití ve srovnání s GCB skupinou (3-leté PFS 20 % vs 65 %, $p=0,01$, 3-leté OS 50 % vs 74 %, $p=0,03$). Přestavba genu *MYC* byla prokázána pouze u 1 pacienta, a to ve skupině ABC, zmožnění/amplifikace genu *MYC* bylo detekováno u 9/36 pacientů (25 %) s tendencí častějšího výskytu ve skupině GCB. Přestavba genu *BCL2* byla nalezena u 9/37 (24 %) pacientů, přičemž všichni byli zařazeni do GCB skupiny, zatímco zmožnění/amplifikace genu *BCL2*, prokázána u 13/37 (35 %) pacientů, bylo výrazně častěji pozorováno ve skupině ABC.

Závěr:

Naše pilotní data potvrzují rutinní použitelnost platformy nanoString a algoritmu Lymph2Cx pro analýzu molekulárních subtypů DLBCL. Data mohou být využita v kombinaci s výsledky FISH a zhodnocením klinického stavu pro včasnou identifikaci pacientů vhodných pro moderní léčebné modality.

Práce je podporována granty IGA_LF_2024_001 a MZ ČR DRO (FNOL_00098892).

Vznik patologického klonu z X monosomické buněčné linie při onemocnění CLL u pacientky s konstitučním mozaicismem s aneuploidii chromosomu X

Vohradská, P.¹, Dvořák, P.¹, Procházka, T.², Jaklová, R.¹, Tesařová, K.¹, Sládková, K.¹, Šubrt, I.¹

¹ Ústav lékařské genetiky LF UK a FN Plzeň

² Hematologicko-onkologické oddělení FN Plzeň

U pacientky s nově diagnostikovanou indolentní CLL bylo provedeno cytogenetické vyšetření nádorových buněk z periferní krve po kultivaci s IL2/DSP30 stimulací buněčného dělení patologických B-lymfocytů. Ve všech hodnocených mitózách byl zjištěn aberantní karyotyp s monosomií chromosomu X a s derivovaným chromosomem 14, který vznikl z translokace t(8;14)(q21.2;p11.2). Důsledkem přestavby je nadpočetná kopie genu MYC (8q24) v karyotypu. Hodnocením interfázních jader byla zjištěna přítomnost X monosomických a X trisomických jader a bylo vysloveno podezření na konstituční mozaicismus s aneuploidii chromosomu X.

Pro ověření konstitučního mozaicismu bylo provedeno cytogenetické vyšetření buněk z periferní krve po kultivaci s PHA stimulací buněčného dělení T-lymfocytů. Kromě mitóz s monosomií chromosomu X jako jedinou aberací a mitóz s trisomií chromosomu X (konstituční mozaicismus) byly zachyceny i mitózy s monosomií X a s derivovaným chromosomem der(14)t(8;14). Nález ukazuje na spontánní buněčné dělení B-CLL nádorových buněk v prostředí in vitro bez stimulace. Pro ověření konstitučního mozaicismu bude při další kontrole pacientky doplněno molekulárně-cytogenetické vyšetření buněk buklí sliznice.

Prezentovaná kazuistika je vzácným příkladem onemocnění CLL u pacientky s konstitučním mozaicismem s aneuploidii chromosomu X. Vyšetření karyotypu nádorových buněk potvrdilo údaje z literatury o téměř výlučném vzniku patologického klonu z X monosomické linie u pacientek s hematologickým onemocněním a mozaicismem zahrnujícím monosomii chromosomu X. Dle některých literárních zdrojů lze předpokládat, že absence jednoho chromosomu X by mohla být příčinou zvýšené proliferativní schopnosti leukemických buněk nebo naopak potlačovat jejich apoptózu v souvislosti s X vázanými geny, které mají vztah k imunitě a kancerogenezi. Z tohoto úhlu pohledu diskutujeme v příspěvku možný prognostický význam nadpočetné kopie genu MYC (8q24) pro vývoj onemocnění u naší pacientky.

Cytogenomika dětských pacientů s Wilmsovým tumorem ve FN Brno

Šmejkal J. ¹, Nastoupilová L. ¹, Štěrba J. ², Mú drý P. ², Bajčiová V. ², Šmuhařová P. ¹, Ondroušková E. ¹, Čábelová K. ¹, Bryjová L. ¹, Chrást L. ¹, Plotěná E. ¹, Mejstříková S. ^{1,3}, Pokorná P. ³, Neradil J. ⁴, Kuttnerová Z. ², Jarošová M. ^{1,2,5}

¹ CMBG, IHOK, FN a LF MU Brno;

² KDO, FN a LF MU Brno;

³ CEITEC MU Brno;

⁴ PŘF MU Brno;

⁵ ULGG FN MU Brno

Úvod: Wilmsův tumor (WT) je nejčastější solidní maligní nádor ledvin v dětském věku. Prevalence onemocnění je přibližně 1:10 000 dětí. 90 % nádorů se manifestuje ve věku 1–7 let, nejčastější věk diagnózy je mezi 3–4 lety. WT je výsledkem maligní transformace abnormálně perzistujících renálních kmenových buněk, které si mohou zachovat embryonální diferenační potenciál. WT je tedy spojen s časným vývojem ledviny. Zatímco většinou jde o nádory vzniklé *de novo*, přibližně 9–17 % všech případů malignit je spojeno s genetickými syndromy. Pokroky v léčebných protokolech umožnily u většiny pacientů dosáhnout přežití přesahující 90 %. Bohužel u pacientů s nepříznivou prognózou a vyšším stádiem onemocnění je míra recidivy WT stále vysoká (až 15 %). Rekurentní genetické změny, pozorované u WT, jsou zisk 1q, LOH 1p/16q/11p15 a mutace v genech WT1, SIX1, SIX2, IGF2, TP53, MYCN, TRIM28 a geny zodpovědné za maturaci miRNA molekul.

Metody a soubor pacientů: V letech 2021–2024 bylo na KDO FN Brno diagnostikováno a léčeno 23 případů WT. Jednalo se v 64 % o dívky a v 36 % o chlapce s mediánem věku 3 roky. U 18 pacientů bylo provedeno klasické cytogenetické vyšetření, vyšetření pomocí metody FISH se sondami WT1, N-MYC a u 6 pacientů arrayCGH. Pacienti s relapsem onemocnění (4) byli následně vyšetřeni NGS sekvenováním somatického a germinálního genomu a dále byla u těchto pacientů vyšetřena i fosforylace kináz.

Výsledky a závěr: V našem souboru pacientů jsme našli cytogenetické aberace chromosomů, které jsou popisovány v odborné literatuře u WT a korelovaly s klinickým stavem a prognózou pacientů. Nejčastěji pozorovanou strukturální chromosomovou aberací byla parciální trisomie dlouhého ramene chromosomu 1, která je spojena s horším klinickým průběhem onemocnění u pacientů s WT. Práce bude zaměřena na obecné seznámení posluchačů s problematikou onemocnění WT jako nejčastějším solidním maligním nádorem ledvin dětského věku.

Genomická heterogenita ve vývoji nádorových klonů u primárních a recidivujících astrocytárních gliomů

Libuše Lizcová¹, Halka Lhotská¹, Karolína Janečková¹, Lucie Hodaňová¹, Karla Svobodová¹, Tatiana Aghová¹, Lenka Pavlišťová¹, Jana Limbergová¹, Veronika Ticháčková¹, Šárka Ransdorfová², Jiří Soukup³, Filip Kramář³, David Netuka³, Zuzana Zemanová¹

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

² Ústav hematologie a krevní transfúze;

³ Neurochirurgická a neuroonkologická klinika 1.LF UK a ÚVN

Astrocytární gliomy, zahrnující astrocytomy grade 2–4 a glioblastom grade 4, představují heterogenní skupinu mozkových nádorů s velmi variabilním biologickým chováním a vznikem recidivujících lézí u většiny pacientů. Během progresu onemocnění dochází k vývoji nádorového klonu a kumulaci nových genetických/epigenetických aberací. Podstata a mechanismus tohoto procesu spojeného s rezistencí na terapii však zatím zůstávají neobjasněny.

Vyšetřili jsme genomický profil párových vzorků (primárního a alespoň jednoho rekurentního) nativní nádorové tkáně u 35 pacientů. Nebalancované aberace jsme detekovali metodami I-FISH (Abbott Molecular, MetaSystems) a aCGH/SNP (Agilent). Mutační stavy genů *IDH1*, *IDH2* a *TERT* a metylační stav promotoru *MGMT* genu jsme vyšetřili pomocí MLPA a MS-MLPA (MRC Holland). U vybraných pacientů jsme provedli analýzu pomocí panelového NGS (Archer Invitae) nebo optického mapování (Bionano).

V primárních i rekurentních nádorech jsme detekovali aberace specifické pro astrocytární nádory, jako jsou mutace *IDH1/IDH2* a *TERT* genu, numerické změny chromosomů 7 a 10, delece genu *CDKN2A/B* a amplifikace genu *EGFR*. Kromě dvou pacientů jsme u všech nemocných našli v recidivujících nádorech nově získané genetické/epigenetické aberace s vysokou frekvencí CNVs, které vedly ke komplexním přestavbám. V 11/33 rekurentních vzorků jsme detekovali lineární vývoj nádorového klonu, tzn. rekurentní léze obsahovaly aberace přítomné v primárních nádorech a současně i nově získané genomické změny. Ve 22/33 případech jsme při rekurenci detekovali nové aberace, a naopak jsme neprokázali přítomnost některých původních změn detekovaných v primárních vzorcích, tedy nález svědčící pro divergentní klonální vývoj. Nejčastěji jsme v recidivujících vzorcích našli změny chromosomových oblastí 4p, 6p, 8q, 9q, 11p a 11q. cnLOH jsme prokázali ve 22 případech, lokalizovanou především v oblastech 7p a 17p. K progresi onemocnění došlo u 28 pacientů.

Rekurentní gliomy jsou geneticky/epigeneticky odlišné nádory od primárních a jsou výsledkem evolučního procesu, který může být řízen proliferací buněk s nově získanými aberacemi nebo klonální expanzí jednoho nebo více subklonů, které byly přítomny již v rámci primárního nádoru. Komplexní cytogenomická analýza buněk recidivujících tumorů je nezbytná nejen pro pochopení tohoto dynamického a velmi heterogenního vývoje genomu astrocytárních nádorů a pro objasnění mechanismů zodpovědných za maligní transformaci buněk, ale i pro vývoj efektivnější cílené terapie.

Podpořeno MZ ČR AZV-NU21-04-00100, MZ ČR RVO-VFN64165 a GA UK 159020.

Strategie izolace ultra vysokomolekulární DNA pro optické mapování genomu: Řešení výzev při práci s náročnými vzorky

Regina Bezděková Fillerová, Martin Dihel, Irem Mertová, Petr Kvapil

Institute of Applied Biotechnologies, Olomouc, Czech Republic

Strukturní varianty (SV) jsou zásadním typem genetických variant, které významně ovlivňují fenotyp pacienta a jsou klíčovými hráči u celé řady onemocnění. Proto je jejich identifikace nezbytnou součástí moderní genomické analýzy. Existuje mnoho nástrojů pro detekci SV, zejména sekvenování s dlouhým čtením prokázalo velký potenciál pro charakterizaci všech typů SV. Tyto sekvenáčnické techniky jsou ale stále limitovány délkou čtení DNA fragmentů (až 25 kbp). Metoda optického mapování genomu překonává tuto hranici a je v současnosti jedinou technologií, která dokáže pracovat s DNA fragmenty delšími než 1 Mbp.

Práce s dlouhými neporušenými fragmenty DNA vyžaduje unikátní přístup k izolaci ultra vysokomolekulární (UHMW) DNA. S využitím kitů a protokolů pro technologii optického mapování (Bionano) jsme optimalizovali postupy extrakce UHMW DNA z různých typů vzorků, a to jak čerstvých, tak mražených biologických materiálů, které často slouží pro potřeby biobankingu.

Jako materiálem první volby pro izolaci UHMW DNA se jeví periferní krev. Jsme však schopni extrahovat ultra dlouhé fragmenty DNA i ze vzorků kostní dřeně a tkání, a to i v případě limitujícího množství. Vhodným zdrojem pro izolaci UHMW DNA v oblasti humánní medicíny se jeví i buněčné suspence sortovaných, kultivovaných, případně kryoprezervovaných buněk. Zde nacházíme i možnost vytvoření optické mapy pro potřeby prenatalní diagnostiky izolací UHMW DNA z amniocytů nebo choriových klků.

Technologie optického mapování genomu není omezena jen na lidský genom; UHMW DNA lze izolovat také z tkání zvířat, rostlin a mikroorganismů. Díky této rozmanitosti vzorků je optické mapování genomu vhodné pro širokou škálu studií a aplikací diagnostických i výzkumných, zejména v oblasti onkologie a studia genetických onemocnění nebo v oblasti základního výzkumu.

Optické mapování genomu a jeho přínos v diagnostice mnohočetného myelomu

Jana Kotašková^{1,2,3}, Andrea Marečková¹, Eva Ondroušková¹, Michaela Bohúnová¹, Johana Mayerová¹, Dorota Nižňanská¹, Jakub Paweł Porc², Veronika Navrkalová^{1,2,3}, Lucie Bravencová¹, Marie Zádrapová¹, Barbora Sábliková¹, Martin Štork¹, Luděk Pour¹, Sabina Ševčíková⁴, Marie Jarošová^{1,3}

¹ Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika

² Středoevropský technologický institut, Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika

³ Ústav lékařské genetiky a genomiky, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika

⁴ Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) patří mezi onemocnění s vysokou komplexitou genomických aberací. U téměř poloviny případů stojí za rozvojem onemocnění kauzální translokace. Stávající vyšetřovací algoritmus využívá metodu FISH k detekci aberací lokusu IGH. V případě potvrzení disrupce následuje určení fúzního partnera, které probíhá sekvenčně podle frekvence dané translokace. Zahrnuje určení nejčastějších translokací t(11;14)/IGH::CCND1, t(4;14)/IGH::FGFR3, t(14;16)/IGH::MAF, t(14;20)/IGH::MAFB, případně t(6;14)/IGH::CCND3. Nicméně pomocí FISH se nepodaří identifikovat partnera až v 15 % případů. Technik, jak identifikovat translokačního partnera, je více a výběr závisí na možnostech laboratoře. V naší práci jsme testovali potenciál metody optického mapování genomu (OGM).

Materiál a metody: Pomocí metody OGM jsme vyšetřili soubor 25 pacientů s MM. Pro analýzu jsme používali separované nádorové buňky kostní dřeně (CD138+). Do souboru byli zařazeni pacienti (i) bez disrupce IGH (n=7), (ii) s disrupcí a translokací potvrzenou pomocí FISH (n=10), a (iii) s disrupcí bez nalezeného partnera (n=8). Nálezy jsme korelovali s daty získanými pomocí panelového sekvenování (panel LYNX, PMID 34082072) a pomocí mFISH/FISH u vzorků, kde bylo možné tato vyšetření provést.

Výsledek: U všech deseti pacientů s translokací identifikovanou pomocí FISH jsme metodou OGM nálezy potvrdili. U pacientů s disrupcí IGH jsme našli translokační partnery u 5 pacientů z osmi. Pomocí OGM jsme téměř u všech pacientů určili další translokace mimo lokus IGH. Dále jsme identifikovali řadu strukturních variant, které považujeme za závažné. Jednalo se o rozsáhlé ztráty heterozygotnosti (LOH), bialelické defekty nádorových supresorů (*CDKN2A/CDKN2B/RB1/TP53*) nebo amplifikace onkogenů (*MYC*). Tyto defekty se u myelomu zatím rutinně nevyšetřují.

Závěr: Optické mapování patří mezi pokročilé technologie analýzy strukturních variant, které si hledají cestu do diagnostiky. Na našem souboru jsme potvrdili potenciál této metody v diagnostickém použití u MM. OGM úspěšně identifikovalo neznámé translokační partnery u pacientů s disrupcí genu IGH, odhalilo řadu závažných aberací, které zůstávají při současném nastavení vyšetřovacího algoritmu skryty, a potvrdilo heterogenitu genetických změn u MM.

Podpořeno MZ-CR AZV NU21-03-00076, MZ-CR RVO 65269705, MUNI/A/1558/2023, a projektu National Institute for Cancer Research (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5102) - Funded by the European Union – Next Generation EU.

Vysokokapacitní cytogenomické metody pro analýzu komplexního karyotypu u chronické lymfocytární leukémie

Adamová S.^{1,3}, Stránská K.^{1,2,3}, Svatoň J.^{2,3}, Černovská K.^{1,2}, Porc J.P.², Ondroušková E.³, Kazdová N.³, Závacká K.^{2,3}, Bohúnová M.³, Rausch T.⁴, Pál K.², Hynšt J.², Beneš V.⁴, Pospíšilová Š.^{1,2,3}, Kotašková J.^{1,2,3}, Jarošová M.^{1,3}, Plevová K.^{1,2,3}

¹ Ústav lékařské genetiky a genomiky, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

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

³ Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

⁴ Evropská laboratoř molekulární biologie (EMBL), Heidelberg, Německo

Úvod: U pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) s nepříznivou prognózou se často vyskytuje komplexní karyotyp (CK), který může zahrnovat numerické i strukturní varianty (SV). Moderní vysokokapacitní technologie, jako jsou sekvenování s dlouhým čtením (LRS), analýza konformace chromatinu (Hi-C) a optické mapování genomu (OGM), nabízejí detailní analýzu genomu ve vysokém rozlišení. Pokusili jsme se proto rozhodnout jejich přínos pro charakterizaci CK u CLL.

Metody: CK byl zjištěn při rutinním vyšetření pomocí chromosomového pruhování (CpG/IL-2 stimulace) a mFISH. Doplnující vyšetření bylo provedeno genomickými čipy (CytoScan HD, Affymetrix). Vysokomolekulární DNA byla sekvenována na platformě PromethION (Oxford Nanopore Technologies); data byla analyzována nástrojem Delly a následně filtrována oproti referenčnímu datasetu 1000 LRS genomů. Pro analýzu SV detekovaných OGM (Bionano Genomics) byl použit postup Rare Variant Analysis. Pro detekci aberací metodou Hi-C (Micro-C, Dovetail Genomics) byly aplikovány EagleC a NeoLoopFinder.

Výsledky: U 10 CLL pacientů s CK jsme porovnali data z rutinních cytogenomických i vysokokapacitních metod. Výsledky analýzy počtu kopií DNA byly srovnatelné napříč všemi použitými metodami. Naopak v detekci SV se jednotlivé metody lišily v počtu detekovaných genomických zlomů. Metody LRS a OGM detekovaly vysoký počet delecí a duplikací ≤ 20 kb. Vysokou úspěšnost (82,4 %) měly vysokokapacitní metody také v detekci recipročných translokací, jednoduchých i komplexních (zahrnujících ≥ 3 chromosomy) derivovaných chromosomů, které byly identifikovány metodou mFISH v majoritním klonu. LRS a OGM opakovaně ukázaly vyšší komplexitu aberací ve srovnání s cytogenetickými metodami. Nicméně v detekci minoritních aberací měly vysokokapacitní metody nízkou úspěšnost (38 %).

Závěr: Přesná charakterizace CK může přispět k lepšimu porozumění molekulárním mechanismům vedoucím k progresi CLL a k odpovědi/rezistenci na léčbu. Kombinace pokročilé analýzy genomu s rutinními metodami představuje významný potenciál pro analýzu CK. Stále však existují limity v detekci minoritních klonů a zlomových míst v repetitivních a obtížně mapovatelných oblastech.

Podpořeno MZČR: AZV-NU21-08-00237 a RVO-FNBr65269705, MŠMT: MUNI/A/1558/2023 a NPO-NUVR-LX22NPO5102, spolufinancováno EU – Next Generation EU.

Optické mapování genomu a sekvenování s dlouhým čtením - mají místo v klinické cytogenetice?

Vladimíra Vallová^{1,2}, Dominik Režný¹, Hana Dynková Filková², Miroslav Štolfa², Eva HLadílková², Marta Navařfková², Renata Gaillyová³, Petr Kuglík^{1,2}

¹Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

²Centrum molekulární biologie a genetiky, IHOK, Fakultní nemocnice Brno

³Ústav lékařské genetiky a genomiky, Fakultní nemocnice Brno

Chromozomové aberace a strukturální odchylky DNA jsou jednou z hlavních příčin lidských genetických onemocnění. Jejich detekce je v klinické praxi založena na rutinních technikách klasické a molekulární cytogenetiky, jako např. karyotyp, FISH, MLPA a mikročipové technologie. S rozvojem nových screeningových technologií založených na vyšetření kompletního genomu se však začínají ukazovat jejich hlavní nedostatky – nízké rozlišení a pracnost (karyotyp) a absence detekce balancovaných genetických změn (array-CGH). Tyto nedostatky se ukazují být zásadní především při stanovení přesných zlomových míst u translokací, inverzí a při detekci komplexních cytogenetických přestaveb.

V poslední době se však objevují technologie, které by tyto nedostatky mohly ve velké míře překonat. Jedná se o techniky založené na analýze dlouhých molekul DNA - optické mapování genomu (OGM) a celogenomové sekvenování s dlouhým čtením (LG-WGS). I když jsou obě metody založené na odlišném mechanismu odhalování strukturální variability genomu, obě mohou zásadní mírou přispět k objasnění nejasných cytogenetických nálezů.

V přednášce na vybraných kazuistikách popíšeme využití obou uvedených metod u pacientů s neurovývojovými poruchami a/nebo vrozenými vývojovými vadami. Zaměříme se na porovnání efektivity a přesnosti obou metod při detekci strukturálních přestaveb v klinické praxi a porovnání získaných dat s dostupnými cytogenetickými výsledky.

Podpořeno VaV IP2024, FN Brno a MZ ČR - koncepční rozvoj výzkumné organizace (FNBr, 65269705)

Využití metody optického mapování genomu (OGM) u pacientů s neurovývojovým onemocněním aneb naše cesta za OGM a první zkušenosti.

Řezáčová H.¹, Vosecká T.¹, Novotná D.¹, Kutilová T.¹, Drábová J.¹, Slámová Z.¹, Hančárová M.², Prchalová D.², Ryba L.¹, Tesner P.¹, Havlovicová M.¹

Neurovývojová onemocnění (NVO) představují heterogenní skupinu onemocnění, u nichž postižení centrálního nervového systému (CNS) vede k poruše vývojových dovedností z oblasti motorické, kognitivní, sociální a komunikační. Postižení jedince závisí na rozsahu poškození CNS a může se projevit jednotlivými izolovanými poruchami nebo častěji jejich kombinací. Dle nejnovějšího paradigmatu je většina NVO způsobena genetickými faktory. Nicméně, i přes neustále se rozšiřující poznatky a technické možnosti zůstává kauzální genetická příčina u mnoha pacientů neodhalena. Optické mapování genomu je moderní metoda umožňující vizualizaci a analýzu genomu jedince v jednom kroku. Tato slibná technologie má schopnost identifikovat strukturní varianty genomu, jako jsou inzerce, delece, duplikace, inverze či translokace. Podle nedávného výzkumu vykazuje OGM 98 % shodu s výsledky jiných rutinně využívaných cytogenetických metod (Barseghyan H. et al. 2024). Významnou výhodou technologie OGM je možnost detekovat balancované strukturní aberace, čímž představuje významný přínos ve výzkumu i klinické diagnostice. Prezентujeme tři kazuistiky pacientů s NVO s prokázanou strukturní aberací (duplikace, chromotripse, intragenová duplikace) u nichž byla metoda OGM využita pro porovnání a upřesnění aberací, detekovaných metodami aCGH, MLPA či srWGS.

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

Evoluce způsobů určení pohlaví a pohlavních chromozomů u amniotických obratlovců

Lukáš Kratochvíl

Katedra ekologie PŘF UK, Praha

Amniotičtí obratlovci, tedy sauropsidi (ptáci a plazi) a savci, mají různé způsoby určení pohlaví. Někteří mají pohlaví určené prostředím během inkubace a chybějí jim zcela pohlavní rozdíly v genomu, zatímco jiní mají pohlavní chromosomy. V příspěvku shrnu současné znalosti o evoluci určení pohlaví u této skupiny, fylogenetickou distribuci jednotlivých způsobů určení pohlaví a směry evolučních přechodů. Taky se pokusím vyjádřit k úvahám o ancestrálním stavu a evoluční stabilitě jednotlivých způsobů a jejím možným příčinám.

Prenatální diagnostika chromozomových aberací v ČR

Šípek Antonín Jr.^{1,2,3}, Šípek Antonín^{1,3,4,5}, Klaschka Jan⁶, Malý Marek^{6,7}

¹ Oddělení lékařské genetiky, Thomayerova nemocnice, Praha

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

³ Ústav lékařské genetiky 3. LF UK, Praha

⁴ Oddělení lékařské genetiky, GENNET, Praha

⁵ Oddělení lékařské genetiky, Sanatorium Pronatal, Praha

⁶ Ústav informatiky Akademie věd České republiky, Praha

⁷ Státní zdravotní ústav, Praha

Úvod: Chromozomové aberace jsou významnou příčinou mortality i morbidity a to v prenatálním, perinatálním i postnatálním období. Na detekci nejčastějších chromozomových aberací jsou v těhotenství zaměřeny speciální screeningové a diagnostické metody.

Cíle: Analyzovat absolutní a relativní četnost vybraných typů chromozomových aberací zachycených prenatálně i postnatálně. Následně zhodnotit efektivitu prenatální diagnostiky u vybraných typů diagnóz a související časové trendy.

Metody: Retrospektivní epidemiologická analýza populačních dat získaných z Národního registru vrozených vad, který je součástí Národního registru reprodukčního zdraví, vedeného v rámci Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky. Tyto údaje jsou doplňovány o aktivní hlášení prenatálně zachycených diagnóz, které probíhá pod záštitou Společnosti lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP. Analyzovány byly následující diagnózy: Downův syndrom, Edwardsův syndrom, Patauův syndrom.

Výsledky: Nejčastěji jsou v rámci prenatální diagnostiky zachycovány autozomální trizomie (syndromy Downův, Edwardsův a Patauův), které v dlouhodobém přehledu tvoří přibližně 2/3 všech prenatálně zachycených chromozomových aberací.

Úspěšnost prenatální diagnostiky u Edwardsova a Patauova syndromu přesahuje 90 %, u dalších chromozomálních aberací je nižší.

Závěr: Díky úspěšnému zařazení kombinovaného screeningu prvního trimestru do prenatální péče došlo v České republice ke zlepšení prenatální diagnostiky zejména autozomálních trizomií, které jsou zachycovány jak častěji tak i časněji.

Podpora: Podpořeno MZ ČR - RVO (Fakultní Thomayerova nemocnice – FTN, 00064190)

Centrální evidence vrozených vad v České republice

prof. RNDr. Ladislav Dušek, Ph.D., RNDr. Jitka Jírová

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR

Národní registr vrozených vad je jednou z pěti částí Národního registru reprodukčního zdraví. Jedná se o celoplošný populační registr, jehož správcem je Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, a který je díky legislativnímu ukotvení v zákonu č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování (zákon o zdravotních službách), součástí Národního zdravotnického informačního systému (dále NZIS).

Ačkoli většina pracovišť je do registru zapojena a počet hlášení je uspokojivě porovnatelný s dalšími referenčními zdroji NZIS, celková kvalita dat v databázi bohužel stále vykazuje řadu nedostatků. Velkým problémem je rovněž pracnost spojená s hlášením pro odborný personál. Cílem příspěvku je představit připravené kroky na restart sběru dat o vrozených vadách.

Hlavní změnou v rámci sběru dat bude představená datová standardizace elektronické dokumentace, která by měla vést k automatizaci hlášení a k minimalizaci administrativní zátěže. Tzv. minimální datový standard registru bude obsahovat pouze minimální počet zásadních parametrů, které nelze získat z jiného datového zdroje v rámci NZIS. Veškeré další rozšiřující informace budou čerpány z ostatních databází NZIS, jako jsou Národní registr hrazených zdravotních služeb, ostatní moduly Národního registru reprodukčního zdraví, Národní registr hospitalizovaných a další. Takto propojená soustava informací vytváří komplexní datové zázemí pro hodnocení prevalence vrozených vad, včetně analýz dostupnosti a kvality péče.

Dále budou představeny datové výstupy, které vznikly v rámci validace dat Národního registru reprodukčního zdraví ve srovnání s administrativními daty zdravotních pojišťoven.

Jako ukázka propojenosti a komplexnosti nové datové základny NZIS budou představeny výsledky analýzy četnosti vrozených vad v rodinách, která si klade za cíl popsat opakovaný výskyt vrozených vad u dětí a plodů jedné ženy, a to s ohledem typ diagnózy, region, věk ženy a původ gravidity.

Email: Ladislav.Dusek@uzis.cz, Jitka.Jirova@uzis.cz

Etnicky prevalentní exonová delece genu *CRPPA*

Trková M¹, Čejnová V², Staňková M², Lysá M², Schreiberová L², Dobšáková Z², Štolfa M², Valečková J², Česáková M², Vlasáková A², Burdová A², Fišer M², Lehnerová M², Tajtlová J², Drábová J², Čapková P², Havlíková P², Bobková K², Mrňáková H¹

¹ GENvia, s.r.o., Laboratoř lékařské genetiky, Praha

² Pracovní skupina CzechArray

Bialelické mutace a delece genu *CRPPA* (OMIM*614631) jsou příčinou autosomálně recesivní muskulární dystrofie-dystroglykanopatie s vrozenými malformacemi očí a mozku (Walkerův – Warburgův syndrom). Hypotonie a svalová slabost jsou u homozygotních nosičů přítomné od narození, psychomotorický vývoj je minimální a většinou nepřezijí kojenecký věk. Strukturní abnormality mozku a snížené pohyby plodu lze diagnostikovat prenatálně. Incidence onemocnění je odhadovaná na 1 na 100 000 živě narozených dětí.

V laboratoři GENvia byly v souboru 5400 vyšetřených vzorků metodou array CGH zachyceny identické intragenové homozygotní delece *CRPPA* u dvou plodů se závažným ultrazvukovým nálezem CNS. Následně byly potvrzeny heterozygotní delece u rodičů ze dvou nepříbuzných rodin. Jako náhodný nález byly nalezeny další dvě identické heterozygotní delece u plodů nepříbuzných matek. Delece se stejným rozsahem byla uváděna i ve sdílené tabulce skupiny CzechArray, proto jsme postupně oslovili spolupracovníky po celé České republice. Z dodaných dat a s porovnáním dostupných databází vyplývá, že se jedná o specifickou českou delecí zasahující exony 1 až 9 genu *CRPPA*: 90 heterozygotních nosičů a 13 plodů s homozygotní delecí.

Záchyt delece je (pokud jsou dostupné informace) vázán na romské etnikum a obecně je vysoký v lokalitách s vysokým podílem romské populace. Mohlo by se tak jednat o *founder* („zakladatelskou“) mutaci a k tomuto faktu by se mělo přihlížet v rámci prekoncepční a prenatální péče.

Využití metody array-CGH u pacientů s malým vzrůstem

Skalická Sandra¹, Kučerová Hana¹, Schwarz Martin¹, Michalovská Renáta², Hořínová Věra³, Hůrková Věra⁴, Fišer Miroslav¹

¹ PRENET – prenatalní diagnostika a genetika, Pardubice

² GHC Genetics, s.r.o., Praha

³ Genetická poradna, Nemocnice Jihlava

⁴ Centrum prenatalní diagnostiky a genetiky PREDIKO s.r.o., Zlín

Tělesná výška má polygenní dědičnost a je ovlivněna hormonálními, metabolickými i genetickými faktory. Jako malý vzrůst se zpravidla označuje výška jedince pod 3. percentilem pro daný věk, pohlaví a skupinu populace. Jedná se o obsáhlou skupinu poruch s různým stupněm závažnosti. Malý vzrůst může být součástí řady syndromů a jeho příčiny jsou velmi variabilní, což značně ztěžuje diagnostiku i léčbu. Na základě fyzického vzhledu pacienta je malý vzrůst obecně kategorizován do dvou typů – proporční a disproporční. Proporční malý vzrůst, jak název napovídá, znamená, že končetiny a trup jsou přiměřené velikosti. Disproporční malý označuje stav, kdy má jedinec významný rozdíl ve výšce sezení a stání, neboť bývá porušen růst dlouhých kostí horních a dolních končetin.

Prezentace je zaměřena na představení nálezů získaných metodou array-CGH, která umožňuje detekci významných variant v počtu kopií (CNV). Ve studii byly použity ISCA čipy ve formátu 8 x 60 (Agilent, Santa Clara) se základním rozlišením 240kb (48kb v ISCA oblastech).

Byly analyzovány vzorky DNA izolované z periferní krve 40 pacientů s diagnózou malý vzrůst/trpaslctví. Významné duplikace či delece byly pomocí metody array-CGH nalezeny v 5 případech. Dále u 6 pacientů s negativním výsledkem array-CGH bylo provedeno vyšetření klinického exomu. Patogenní varianta související s diagnózou byla nalezena ve 2 případech.

Přednáška je doplněna o jednotlivé kazuistiky.

Využití SNP arrayí v preimplantačním genetickém testování

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

Repromeda s.r.o., Brno

Preimplantační genetické testování představuje genetické testování embryí za účelem vyloučení chromozomových aneuploidií/aberrací (PGT-A/SR) nebo genových patogenních variant vedoucích k narození postiženého dítěte (PGT-M). Trendem v genetickém testování je využívání technologie NGS, avšak SNP arraye mají stále místo v moderní genetice. Pomocí SNP arrayí lze provádět univerzální nepřímou diagnostiku v rámci PGT-M, ale je možné je využít pro detekci aneuploidií, což pomáhá vyloučit klinicky závažné aneuploidie a efektivněji vybrat embrya pro transfer. Pomocí vhodně zvolených bioinformatických algoritmů lze rozlišit meiotické vs. mitotické chromozomové abnormality i bez DNA vzorků rodičů. Dále lze s pomocí DNA vzorku jednoho rodiče rozlišit maternální vs. paternální původ těchto aneuploidií. Získané informace o typu a charakteru chromozomových chyb lze použít pro určení pořadí embryí pro embryo transfer nebo optimalizaci IVF léčby.

V naší laboratoři využíváme SNP arraye Infinium™ Global Screening Array-24 v3.0 BeadChip, se 654 027 SNP markery, které lze použít pro PGT-M ale i detekci aneuploidií. Důležitou prerekvizitou je vhodně zvolená celogenomová amplifikace, pro tento účel využíváme metodu Multiple Displacement Amplification (MDA). Do výsledné bioinformatické analýzy jsme implementovali algoritmy umožňující rychlejší a přesnější detekci aneuploidií, např. normalizovaný loQR graf, „parent origin B-allele frequency“ graf nebo graf zisku heterozygotnosti.

Data získaná ze SNP arrayí potvrzují, že většina meiotických aneuploidií v embryích je maternálního původu. U aneuploidií v mozaice vidíme rovnoměrné zastoupení chyb maternálně i paternálně zděděných chromozomů, což svědčí o náhodném charakteru mitotických chyb. Frekvence chyb ploidií (polyploidie/haploidie) detekujeme v blastocystách u 1–2% vzorků.

Retrospektívna analýza variantov nejasnej signifikancie detegovaných celogenómovým sekvenovaním s nízkym pokrytím

Tomková E. a kol.

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

Celogenómové sekvenovanie s nízkym pokrytím (LC-WGS) je metóda na detekciu zmien počtu kópií (CNV) v ľudskom genóme, ktorá našla široké uplatnenie v klinickej praxi a v mnohých laboratóriách nahradila tradičnú array CGH. S cieľom zhodnotiť podiel variantov nejasnej signifikancie (VOUS), ktoré sú považované za najväčšiu výzvu pri interpretácii výsledkov celogenómových analýz, a s cieľom zodpovedať otázky týkajúce sa ich ďalšej interpretácie sme v súbore 1112 vzoriek po LC-WGS realizovali rozsiahlu štatistickú analýzu. Analyzované vzorky boli rozdelené do dvoch skupín, a to na 402 vzoriek indikovaných v rámci prenatalnej diagnostiky a 710 vzoriek indikovaných v rámci postnatálnej diagnostiky. V prvej skupine bol podiel VOUS stanovený na 14,81% (32/216), v druhej skupine bolo detegovaných 27,03% (103/381), podiel VOUS z celkového počtu CNV bol stanovený na 22,61% (135/597). Podiel vzoriek so záverom nejasnej signifikancie bol 6,97% (28/402) pre prenatalné vzorky, 11,97% (85/710) pre postnatálne vzorky a 10,16% (113/1112) v celom súbore. Popísali sme vlastnosti detegovaných VOUS a zhodnotili možnosti ich reklasifikácie. V súlade s rastúcim počtom reportov táto štúdia podporuje teóriu, že s väčším počtom vykonaných celogenómových detekcií CNV a ich zvyšujúcim sa rozlíšením bude počet detegovaných VOUS najskôr stúpať, avšak ich reklasifikáciou v čase bude ich podiel naopak klesať, nakoľko bude tendencia radiť VOUS prevažne do kategórie pravdepodobne benígnych variantov. Diagnostická výzva, ktorú VOUS predstavujú, môže byť minimalizovaná prostredníctvom intenzívnej spolupráce klinických genetikov a laboratórnych diagnostikov, pomocou vzájomnej spolupráce laboratórií, zdieľaním informácií a dosiahnutých výsledkov.

Vliv duplikací v regulačních oblastech genu *SHOX* na stav metylace DNA u pacientů s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou a význam změn metylace DNA pro její etiologii

Valeriia Kopytko¹, Kateřina Hirschfeldová², Pavlína Čapková³, Roman Šolc¹

¹ Katedra antropologie a genetiky člověka, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha

² Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha

³ Ústav lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc

Gen *SHOX* se nachází v pseudoautosomálním regionu 1 na konci krátkého raménka chromosomu X a Y (Xp22.32/Yp11.32) a kóduje transkripční faktor, který reguluje proliferaci a diferenciaci chondrocytů v růstových chrupavkách. Haploinsuficience *SHOX* je asociována s Lériho-Weillovou dyschondrosteózou (LWD) a idiopatickým nízkým vzrůstem (ISS). Ve většině případů je způsobena CNV („copy number variation“) zahrnujícími exony *SHOX* a/nebo jeho regulační elementy, nicméně přibližně u 30 % případů příčina patologického fenotypu zůstává neodhalená. Oproti delecím zůstává význam duplikací v některých případech kontroverzní. Duplikace zahrnující CNE („conserved non-coding element“) v blízkosti *SHOX* byly popsány u pacientů s fenotypem LWD/ISS, ale také u zdravých jedinců. Za normálního stavu jsou CpG ostrůvky obklopující gen *SHOX* hypometylovány, což odpovídá skutečnosti, že *SHOX* nepodléhá inaktivaci. Některé studie předpokládají, že změny v úrovni metylace DNA genů mohou být asociovány s přestavbami v jejich okolí, známá je též role změn profilu metylace DNA v etiopatogenezi některých chorob. Naším cílem bylo ověřit platnost těchto předpokladů v případě genu *SHOX*.

Analyzovali jsme dva CpG ostrůvky v genu *SHOX* u 23 zdravých jedinců, u 20 pacientů s fenotypem LWD a duplikací zahrnující regulační elementy *SHOX* a u 30 pacientů s fenotypem LWD/ISS bez detekovaných strukturních a bodových mutací. Pomocí přímého bisulfitového sekvenování vzorků genomické DNA bylo stanoveno, že CpG ostrůvky v oblasti *SHOX* vykazují nižší úroveň metylace u pacientů s duplikací, než u zdravých jedinců, ovšem pouze u jednoho ostrůvku byl zaznamenán rozdíl statisticky významný. Pro stanovení, zda samotné změny v metylaci mohou být zodpovědné za patologický fenotyp, bylo provedeno metylační profilování CpG ostrůvků u pacientů bez nalezené bodové či strukturní mutace. Výsledky této analýzy naznačují, že metylační indexy pacientů se odlišovaly od průměru skupiny zdravých jedinců alespoň o dvojnásobek směrodatné odchylky u 86,6 % pacientů v případě ostrůvku CpG 1, a u 70 % pacientů ve sledovaném úseku ostrůvku CpG 3. Rozdíl v úrovni metylace byl ovšem pozorován u jednotlivých CpG dinukleotidů, nikoliv u všech CpG v ostrůvku zároveň.

U pacientů s duplikací v regulačních oblastech i u pacientů bez detekovaných mutací v regionu *SHOX* byly tedy pozorovány rozdíly v úrovni metylace DNA. Otázkami pro další výzkum zůstávají efekty konkrétních duplikací v závislosti na jejich lokaci, síla reálného biologického efektu pozorované změny metylace i význam změn profilu metylací v etiologii LWD a ISS.

Preimplantační genetické testování strukturních aberací v letech 2021–2023

Horák J., Velebný J., Svobodová N., Račochová E., Koudová M., Stejskal D.

GNTlabs by GENNET, Praha, Česká republika

Strukturní chromozomová aberace u jednoho z partnerů je indikací k preimplantačnímu genetickému testování (PGT-SR) přibližně u každého dvacátého páru, který přichází na kliniku asistované reprodukce. Balancované chromozomové aberace jako Robertsonské translokace, reciproké translokace, pericentrické inverze, paracentrické inverze, inserce či delece jsou spojeny s rizikem tvorby nebalancovaných gamet a mohou vést k potracení plodu, nebo narození postiženého dítěte v případě malého rozsahu nebalancovaných úseků genomu. Plodnost nosiče balancované translokace může být snížena o 20–80%, což v kombinaci s dalšími faktory ovlivňujícími plodnost jedince jako je věk, či kvalita spermogramu může být důvodem k návštěvě kliniky asistované reprodukce. Vyšetření karyotypu obou partnerů je základním genetickým vyšetřením, které by mělo vždy předcházet zahájení cyklu IVF.

K provedení PGT-SR máme na výběr mezi dvěma metodami, které se používají primárně k testování aneuploidií (PGT-A), nebo monogenních chorob (PGT-M). Obecně je možné říci, že pro všechny chromozomové aberace zachycené vyšetřením karyotypu je možné provést PGT-SR metodou NGS podobně jako u běžného PGT-A a součástí vyšetření je tudíž vždy analýza počtu kopií také u všech ostatních chromozomů. Nebalancované chromozomové aberace v podobě mikrodelecí a mikroduplikací se v mnohém podobají monogenním chorobám. Mají zpravidla různou penetranci a expresivitu a jsou zachyceny postnatální či prenatalní array, která je indikována z důvodu fenotypu jedince či plodu. Pro tyto typy aberací je vhodnou metodou k PGT-SR karyomapping využívající stejné SNP čipy, který byly použity pro záchyt kauzální strukturní aberace. Kromě přímé detekce aberace na čipu a vyšetření počtu kopií všech ostatních chromozomů je možné v rámci karyomappingu zvýšit diagnostickou spolehlivost u embrya haplotypovou analýzou s využitím vzorků otce a matky na principu nepřímé genetické diagnostiky.

V letech 2021 – 2023 bylo v naší laboratoři provedeno PGT-SR u 337 pacientů, kterým bylo vyšetřeno celkem 1396 embryí. Metodou karyomapping s využitím SNP array bylo vyšetřeno 48 pacientů a 193 embryí. Ostatní pacienti a embrya byla vyšetřena metodami založenými na principu NGS. Podíl pacientů s indikací k PGT-SR činil u obou metod shodně 5 %. Tento široký soubor pacientů pokrývající celé spektrum PGT-SR nám umožňuje podívat se na tuto problematiku z mnoha různých úhlů pohledu a zasadit ji do aktuálního kontextu reprodukční genetiky a asistované reprodukce. V současnosti je možné provést PGT-SR u každého pacienta, ať už je nosičem balancované či nebalancované strukturní chromozomové aberace.

e-mail: jakub.horak@gennet.cz

Mozaicismus pohlavních chromozomů – případy z laboratoře, kazuistika

Mgr. Soňa Stierandová, Ph.D.

Správné hodnocení a interpretace mozaicismu, jako jednoho z možných mechanismů vzniku patologie, patří k opomíjené, ale velmi důležité oblasti v klinické genetice. Mozaicismus pohlavních chromozomů sebou navíc přináší výzvu v podobě nerovnoměrného přenosu z rodičů na potomky a spolu s tím i možnost projevů X-vázaných onemocnění. Cytogenomika nám, díky své robustnosti, umožňuje vidět velké genomické mozaiky, se kterými by si molekulárně-genetické metody jako třeba NGS nebo ddPCR neuměly zcela poradit. Spojení karyotypu, aCGH a FISH je účinným nástrojem při hodnocení mozaicismu.

ABSTRAKTY POSTERŮ

Retrospektivní vyšetření přestavb genů IGL, IGK a MYC u pacientů s mnohočetným myelomem

Bohúnová Michaela¹, Ondroušková Eva¹, Fidrichová Anna¹, Bryjová Lenka¹, Kotašková Jana^{1,3}, Štork Martin², Pour Luděk², Jarošová Marie¹

¹ Centrum molekulární biologie a genetiky, Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity, Brno

² Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity, Brno

³ Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova Univerzita, Brno

Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je klonální lymfoproliferativní onemocnění charakterizované zvýšeným počtem plasmocytů v kostní dřeni a značnou klinickou i genetickou heterogenitou. Pacienty lze i přes tuto různorodost rozdělit podle primární genetické změny do dvou hlavních skupin, které se liší prognózou: hyperdiploidní (zmnožení počtu chromosomů, především lichých) a s přestavbou genu IGH. První skupina má relativně příznivou prognózu, u druhé riziko závisí na konkrétním partnerovi translokace.

Pro upřesnění prognózy a predikci odpovědi na léčbu jsou v rámci rutinní diagnostiky MM prováděny mimo jiné vyšetření metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Základní panel zjišťuje aberace oblastí 1p/1q, 13q, 17p a genu IGH, následně se dle výsledku IGH došetřuje hyperdiploidie chromosomů 5, 9 a 15 nebo translokace t(4;14), t(11;14), t(14;16), t(6;14) a t(14;20). V běžné praxi nevyšetřované aberace genů IGL, IGK a MYC mají dle novějších prací negativní prognostický význam, a vzhledem k jejich častému výskytu i u pacientů s hyperdiploidii můžou jejich aberace ovlivnit původní zařazení pacienta do skupiny s příznivější prognózou.

Metody

Retrospektivně bylo vyšetřeno 77 vzorků separovaných plasmocytů od IGHnegativních pacientů s nově diagnostikovaným MM (IHOK FN Brno, 2020–2022). Metodou FISH byly vyšetřeny fúze, přestavby a početní změny genů MYC, IGL a IGK.

Výsledky

V kohortě 77 převážně mužských pacientů (53 %) s mediánem věku v době diagnózy 68 let byla většina (61 %) zařazena do kategorie R-ISS II dle stádia onemocnění. Progrese nastala celkem u 45/77 (58 %) pacientů (celková doba do progrese PFS průměrně 17,3 měsíce), průměrné celkové přežití OS bylo 26 měsíců. U 74/77 pacientů byla detekovaná hyperdiploidie, přičemž v 77 % případů byla asociována s aberacemi v genech IGL, IGK a MYC. Tyto aberace zahrnovaly vznik fúzních genů (IGL::MYC 7/77, IGK::MYC 1/77), disrupce (MYC 16/77, IGL 10/77, IGK 1/77), zmnožení intaktního genu (MYC 20/77, IGK 11/77, IGL 2/77), amplifikace (MYC 1/77) a ztráty jedné kopie genu (IGL 15/77, MYC 2/77). U 51 % pacientů byly zaznamenány aberace více genů současně. Vliv na průběh onemocnění a celkové přežití měly z hlediska statistiky aberace genu MYC: byl pozorován statisticky významně nižší medián PFS (14 vs. 28 měsíců, p=0,033) oproti pacientům bez aberací v tomto genu, podobně byl zjištěn i rozdíl mezi OS těchto skupin (u OS ale krátká doba sledování a pouze 20 % zesnulých pacientů).

Závěr

Tato práce přinesla přehled aberací v genech IGL, IGK a MYC u pacientů s MM a přiblížila jejich význam v kontextu klinického obrazu onemocnění. Nejčastěji byly pozorovány aberace v genu MYC a jejich přítomnost měla negativní vliv na dobu dogrese i celkové přežití pacientů s těmito změnami. Do budoucna by bylo vhodné tyto zjištění dále ověřit, aby mohlo dojít k celkové revizi nebo jejich implementaci do stávajících prognostických systémů. Hledání prognosticky významných aberací je u MM důležité také z hlediska vývoje cílené a personalizované terapie.

Podpořeno z MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705).

Cytogenomická a molekulárně biologická analýza nádorového genomu pacientů s myeloidními malignitami se zaměřením na akutní myeloidní leukémii s komplexními změnami a na analýzu genu MECOM

Lenka Bryjová¹, Kateřina Čábelová¹, Eva Ondroušková¹, Michaela Bohúnová¹, Petra Šmuhařová¹, Jiří Šmejkal¹, Jana Kotašková¹, Ivana Ježíšková¹, Adam Folta¹, Dagmar Smitalová¹, Michael Doubek^{1,2,3}, Barbora Weinbergerová², Libor Červinek², Anna Panovská², Daniela Žáčková², Šárka Pospíšilová^{1,2,3}, Marie Jarošová^{1,2,3}

¹Centrum molekulární biologie a genomiky, IHOK, FN Brno, Brno

²Interní hematologická a onkologická klinika, FN Brno a Lékařská fakulta MU, Brno

³Ústav lékařské genetiky a genomiky, FN Brno a Lékařská fakulta MU, Brno

Akutní myeloidní leukémie (AML) tvoří až 80% akutních leukémií u dospělých. U 10–12 % těchto pacientů se vyskytuje komplexní karyotyp (KK), který je definovaný jako nález ≥ 3 změn v karyotypu, kdy alespoň jedna z nich je strukturního charakteru. Mezi nejčastější změny v KK patří nebalancované změny zahrnující ztráty genetického materiálu ramen chromosomů 5q, 7q a/nebo 17p. Nález více jak 3 změn zahrnující tyto delece je označován jako tzv. typický KK (T-KK), zatímco jejich nepřítomnost v KK definuje skupinu atypického KK (A-KK).

Podle WHO klasifikace akutních leukémií a souvisejících neoplázií patří změny na chromosomu 3q26.2 mezi rekurentní chromosomové aberace, které jsou pozorovány u 1–2,5 % u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) a s akutní myeloidní leukémií (AML) a až v 25–40 % u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v blastické fázi onemocnění. V oblasti 3q26.2 je lokalizován gen MECOM. Chromosomové změny na chromosomu 3, inverze nebo translokace (inv(3)/t(3;3)), vedou k deregulaci genu MECOM (transkripčního faktoru, který indukuje leukemickou transformaci regulací svých cílových genů) a jeho nadměrné expresi, jejíž důsledkem je nepříznivá prognosa nemocných.

Cílem naší práce bylo provést komplexní analýzu vlastního souboru nemocných s AML s KK a také souboru nemocných s myeloidními malignitami s přestavbou genu MECOM (určit typy a frekvenci aberací genu MECOM, jeho genovou expresi).

Provedli jsme komplexní genetickou analýzu souboru 62 pacientů (29 žen a 33 mužů, medián věku 65 let) s AML s KK a pacientů s myeloidními malignitami s přestavbou genu MECOM, diagnostikovaných a léčených na IHOK FN Brno v letech 2014–2024. DNA těchto pacientů jsme analyzovali metodami klasické cytogenetiky, FISH, mFISH/mBAND, arrayCGH, cílenou analýzou NGS (panel Agilent a Archer), Q-RT-PCR pro určení hladiny exprese genu MECOM a 1 pacient byl vyšetřen metodou optického mapování genomu (OGM).

T-KK byl pozorován u 22 pacientů, A-KK u 10 pacientů. T-KK s delecemi na všech třech chromosomech mělo 7 pacientů, kombinace delecí na dvou chromosomech byla nalezena u 8 pacientů, 3 pacienti měli pouze delecí na chromosomu 7q a 3 pacienti měli pouze delecí na chromosomu 5q. Ostatní nálezy byly velmi heterogenní.

Cytogenetická a FISH analýza potvrdila přestavbu genu MECOM u 16 pacientů, u dalších 10 pacientů došlo k zisku chromosomové oblasti s genem MECOM, u 4 pacientů byl lokalizován gen MECOM na derivovaném chromosomu a u 1 pacienta došlo k delecí 1 kopie genu. Následná cílená NGS a Q-RT-PCR doplňuje komplexní informace o přestavbě a heterogenitě exprese genu MECOM.

V našem příspěvku budeme prezentovat výsledky společné cytogenomické, molekulárně biologické a klinické analýzy souboru pacientů s myeloidními malignitami se zaměřením na AML s KK a na změny genu MECOM. Ukážeme detailní analýzy přestaveb genomu těchto pacientů, včetně analýzy přestavby genu MECOM a heterogenitu jeho exprese. Na základě výsledků uvedených metod budeme laboratorně i klinicky charakterizovat pacienty, kteří jsou prognosticky nepříznivou skupinou nemocných.

Podpořeno grantem: MZ-CR RVO 65269705.

Detekce metylace promotoru *MGMT* genu pomocí dvou přístupů s odlišným principem detekce mCpG u nemocných s glioblastomem

Halka Lhotska^{1*}, Karolina Janeckova¹, Tatiana Aghova¹, Hana Cechova², Jaromir Macoun³, Libuse Lizcova¹, Karla Svobodova¹, Lucie Hodanova¹, Veronika Ticháčková¹, Dora Konecna⁴, Jiri Soukup⁵, David Netuka⁴, Zuzana Zemanova¹

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

² Oddělení HLA, ÚHK, Praha;

³ Oddělení klinického hodnocení, VFN a 1. LF UK v Praze;

⁴ Neurochirurgická a neuroonkologická klinika, 1. LF UK a ÚVN v Praze;

⁵ Oddělení patologie, 1. LF UK a ÚVN v Praze,

Glioblastom je nejčastějším maligním onemocněním mozku s velmi špatnou prognózou. Snížená exprese O-6-metylguanin-DNA metyltransferázového (*MGMT*) genu (10q26.3), ovlivněná zejména metylací dvou diferenciallyně metylovaných oblastí (DMR1 a DMR2), je spojena s lepší odpovědí na léčbu temozolomidem. Vhodné metody detekce metylace promotoru *MGMT* genu a určení odpovídajících hodnot cut-off jsou stále předmětem diskuse.

Retrospektivní analýza byla provedena na souboru 108 pacientů s histologicky a geneticky definovaným glioblastomem za použití metylačně specifického Sangerova sekvenování (sSeq) a metylačně specifické MLPA (MS-MLPA). Pomocí metody sSeq byla detekována metylace v oblasti DMR2 u 32 vzorků (31 %) a v oblasti DMR1 u 13 vzorků (12,6 %). Metylace detekovaná metodou MS-MLPA pomocí sond *MGMT_215*, *MGMT_190* a *MGMT_124* z kitu ME012-A1 (nacházejících se v oblastech DMR1 a DMR2) byla v souladu s metylací příslušných CpG dinukleotidů analyzovaných pomocí sSeq (p-value = 0,005 pro sondu *MGMT_215*; p-value < 0,001 pro sondu *MGMT_190*; p-value = 0,016 pro sondu *MGMT_124*). Práh pro detekci metylace metodou MS-MLPA byl stanoven analýzou dat získaných oběma metodami pomocí PCA a ROC křivek na hodnotu 0,362. Metylace promotoru *MGMT* genu byla potvrzena u 36 % vzorků. Tito pacienti měli statisticky významně lepší celkové přežití (p = 0,003).

Výsledky naší studie ukazují, že stanovený práh pro detekci metylace metodou MS-MLPA je diagnosticky funkční a umožňuje stratifikaci pacientů, kteří profitují z léčebných protokolů zahrnujících temozolomid. Detailní analýza promotoru *MGMT* genu může přispět k přesnější a personalizované léčbě pacientů s glioblastomem.

Tato studie byla podpořena granty NU21-04-00100, GIP-22-NL-02-846 a RVO-VFN64165.

SKÚSENOSTI NÁŠHO PRACOVISKA S IDENTIFIKÁCIOU MUTÁCIÍ V IMUNOGLOBULÍNOVOM GÉNE *IGHV* U PACIENTOV S CHRONICKOU LYMFOCYTOVOU LEUKÉMIOU OD ROKU 2018.

Lukačková R.¹, Majerová L.¹, Tomková E.¹, Tóthová K.¹, Tatayová L.¹, Šprincová A.², Kopcsayová D.²

¹ Oddelenie klinickej genetiky MEDIREX a.s., Bratislava

² Oddelenie klinickej genetiky MEDIREX a.s., Košice

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je charakterizovaná ako klonálna proliferácia a akumulácia zreých CD5+ B-lymfocytov v periférnej krvi, kostnej dreni, lymfatických uzlinách a slezine. U CLL sú rekurentné chromozómové aberácie podstatné pre stratifikáciu pacientov do prognostických skupín. Na stanovenie prognózy sa využívajú aj rôzne molekulárne markery, ktoré umožňujú predikovať priebeh ochorenia. Nezávislým prognosticky významným markerom CLL je stanovenie mutačného statusu génu *IGHV*, ktorý kóduje variabilnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínov. Podľa mutačného statusu *IGHV* sa pacienti delia do dvoch skupín. Pacienti, ktorých *IGHV* vykazuje v nukleotidovej sekvencii oproti zárodočnej línii rozdiel >2%, sú nositeľmi tzv. mutovaného génu *IGHV* (*M-IGHV*), ktorý sa spája s miernejším priebehom ochorenia a definuje potenciálne indolentnú formu CLL. Druhá skupina pacientov, kde bázy rozdiel oproti zárodočnej línii tvorí ≤ 2%, sú pacienti s nemutovaným stavom *IGHV* génu (*UM-IGHV*), ktorý koreluje s horšou prognózou a kratším prežívaním. Za obdobie 01/2018 – 07/2023 sme vyšetrili 2657 pacientov s podozrením na CLL. Zastúpenie mužov/žien v súbore bolo 55,9%/44,2%. Na molekulovú analýzu sme používali periférnu krv alebo kostnú dreň s protizrážavým roztokom EDTA. Pomocou fragmentačnej analýzy sme identifikovali prestavby génu *IGH* (gén pre ťažký reťazec imunoglobulínu) a následným Sangerovým sekvenovaním sme zisťovali mutačný status génu *IGHV*. Monoklonálnu populáciu B-lymfocytov sme stanovili u 77% vyšetrených vzoriek a u ďalších 21% sme detegovali rôzne typy iných populácií. Po stanovení klonality bolo možné určiť mutačný status *IGHV* u 73% pacientov (*M-IGHV* 40% a *MU-IGHV* 33%). Polyklonalita B-lymfocytovej populácie u zdravého jedinca je dôsledkom rôznej dĺžky preskupených génov *IGHV*. U pacienta s CLL je typická prítomnosť monoklonálnej populácie, pri ktorej jeden patologický klon úplne potlačil ostatné klony. V prípadoch neurčeného statusu *IGHV* (bi-,tri-, polyklon) je vhodné s odstupom času vyšetrenie opakovať na stanovenie definitívnej diagnózy. V našej práci sme sa zamerali práve na to, ako sa mení klonálny profil a *IGHV* status u pacientov v progresii CLL. Vysoký výskyt atypických modelov poukázal na dôležitosť vyšetrenia klonality nádorovej populácie suspektných pacientov s CLL. Výsledkom diagnostiky a správnej interpretácie prognostických faktorov je včasná stratifikácia CLL pacientov pre voľbu vhodného terapeutického manažmentu podľa rizika.

PRESTAVBA *RUNX1* GÉNU U PACIENTOV S DIAGNÓZOU AML

V. Ondreičková, K. Lengyelová, L. Tatayová, A. Blahová, A. Žákovičová, R. Lukačková

Oddelenie lekárskej genetiky, Medirex a.s

Akútne myeloidná leukémia (AML) je heterogénna hematologická malignita charakterizovaná nekontrolovanou proliferáciou nediferencovaných blastov v kostnej dreni a periférnej krvi. Prognóza AML je variabilná a závislá hlavne od molekulárno-genetických zmien. Jedným z najčastejšie mutovaných génov pri hematologických malignitách je gén *RUNX1*. Nachádza sa na chromozóme 21q22 a zohráva dôležitú úlohu pri diferenciácii hematopoetických buniek. V našej práci predstavujeme prípady troch pacientov s diagnózou AML, u ktorých sme zistili aberácie génu *RUNX1*.

V prvej kazuistike ide o 54 ročného pacienta, ktorý mal v čase diagnózy normálny karyotyp. Následne bol transplantovaný a po roku od transplantácie nastal relaps. Cytogenetickým vyšetrením sme identifikovali patologický karyotyp s $t(3;21)(q26;q22)$, ktorý sme následne potvrdili FISH metódou.

V druhej kazuistike prezentujeme prípad 73 ročnej pacientky, ktorá mala pri vstupnom vyšetrení normálny karyotyp, po 9 mesiacoch nastal relaps. Cytogenetická analýza odhalila patologický karyotyp s $t(10;21)(q24;q22)$. Do dvoch týždňov od tohto nálezu pacientka zomrela.

Posledná je kazuistika 61 ročnej pacientky, ktorá mala vstupný cytogenetický nález $t(1;21)(p11;q22)$. FISH metódou sme potvrdili zisk *RUNX1* génu.

Našou prácou poukazujeme na dôležitosť genetického vyšetrenia pri diagnostike a liečbe AML.

Kľúčové slová: AML, *RUNX1*, translokácia, kazuistika

Del(1p32) is an early and high-risk event in relapsed multiple myeloma patients with extraosseous plasmacytomas

Ondrouskova Eva^{1*}, Stork Martin^{1*}, Bohunova Michaela¹, Boichuk Ivanna¹, Fric Dominik¹, Adam Zdenek¹, Krejci Marta¹, Sandecka Viera¹, Knechtova Zdenka¹, Radova Lenka^{2,3}, Jelinkova Zuzana⁴, Adlerova Tatana⁴, Krticka Milan⁵, Nekuda Vladimir⁵, Borsky Marek¹, Kotaskova Jana^{1,2,3}, Sevcikova Sabina⁷, Jarosova Marie^{1,3}, Pour Ludek¹

* Contributed equally to this work and are joint first authors.

¹ Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

² Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³ Department of Medical Genetics and Genomics, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁵ Department of Burns and Plastic Surgery, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Czech Republic

⁶ Trauma Surgery Department, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁷ Babak Myeloma Group, Department of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

In multiple myeloma (MM), the accumulation of high-risk aberrations is one of the key hallmarks related to disease spread beyond the bone marrow, resulting in extraosseous plasmacytomas (EMM). We analyzed paired samples of separated bone marrow plasma cells (BMPCs) and plasmacytoma tissue plasma cells (TPCs) from 22 EMM patients using interphase fluorescent in situ hybridization (I-FISH), assessing IGH, t(4;14), t(11;14), t(14;16), hyperdiploidy, del17p, 13q14, and 1p32/1q21. Moreover, we retrospectively analyzed I-FISH data from 111 newly diagnosed EMM patients, 56 relapsed EMM patients, and 243 MM patients without a history of EMM.

The 1p32/1q21 aberrations were present in 90.9 % (20/22) of the EMM patients' paired samples. The incidence of 1p32/1q21 aberrations was higher in TPCs than in BMPCs (86.4 % (19/22) vs. 68.2 % (15/22)). Del(1p32) was found in 31.8 % (7/22) of the patients, with 85.7 % (6/7) of cases shared between BMPCs and TPCs. In the population study of EMM patients, we found the highest incidence of del(1p32) in relapsed EMM patients compared to newly diagnosed EMM patients or MM patients without EMM (28.6 % (16/56) vs. 20.7 % (23/111) vs. 11.1 % (27/243); p=0.002). In the relapsed EMM patients, there was a clear negative prognostic impact of del(1p32) on overall survival (2.7 months (95% CI: 1.1–6.8) compared to 10.6 months (95% CI: 4.6–NA), p=0.001).

The 1p32/1q21 aberrations are frequent findings in EMM patients. Del(1p32) is a frequent and high-risk aberration in relapsed EMM patients. Del(1p32) may play an important role during the initial stages of EMM development.

Support:

NU21-03-00076, Conceptual development of research organization (FNBr 65269705), Program EXCELLES, ID Project No. LX22NPO5102; LM2023067 funded by MEYS CR)

Prediktivní biomarker ERBB2 u adenokarcinomu žaludku a gastroezofageální jankce

Martina Peřinová^{1,2}, Denisa Drozdková^{1,3}

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

² Ústav klinické a molekulární patologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

³ Ústav klinické a molekulární patologie, Lékařská fakulta, Ostravská Univerzita

HER2, epidermální růstový faktor, membránový receptor regulující buněčnou proliferaci a přežití, je nadměrně exprimován u 15–30 % adenokarcinomů žaludku a gastroezofageální jankce (GEJ). HER2 slouží jako prognostický a prediktivní biomarker, který umožňuje cílenou anti-HER2 terapii zlepšující přežití pacientů s pokročilým HER2 pozitivním karcinomem. Analyzovali jsme exprese HER2 u nádorů žaludku a GEJ pomocí imunohistochemie (IHC) a fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Zjistili jsme 31% pozitivitu HER2 u IHC 2+ vzorků hodnocených jako ISH pozitivní, přestože je předložený soubor pacientů malý, podporuje nová doporučení pro hodnocení HER2 positivity z prosince 2023. Tato kritéria optimalizují léčbu pacientů s karcinomem žaludku a GEJ.

Myelodysplastické neoplázie (MDS) s izolovanou delecí 5q

Radová A., Navrátilová J., Holzerová M., Urbánková H., Machová R. & Papajík T.

Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc

Nejčastějším cytogenetickým nálezem u pacientů s MDS je intersticiální delecce oblasti 5q (přibližně u 20 %). Pouze 5 % pacientů s touto aberací je klasifikováno dle WHO klasifikace jako low-risk subtyp MDS-del(5q).

Dle cytogenetického skórovacího systému (Schanz *et al.*, 2012) vykazují pacienti s izolovanou del(5q) dobrou prognózu (zahrnuje i pacienty s 1 přídatnou aberací vyjma aberací chromosomu 7 – dále označováno jako 5q-). Rozsah del(5q) je variabilní a ukazuje se dle literatury, že pacienti s aberací telomerické oblasti 5q mají agresivnější průběh onemocnění. Chování tohoto low-risk subtypu MDS může být potencionálně ovlivněno i dalšími známými faktory (mutace v *TP53* nebo *SF3B1*).

Cílem této studie bylo analyzovat soubor MDS pacientů s prokázaným nálezem 5q-, určit přídatné aberace a detekovat telomerickou delecí oblasti 5q. Pro detailní zmapování rozsahu del(5q) využít metodu arrayCGH (*Agilent*) a pro detekci variant ve 45 kandidátních genech metodu MPS (*Illumina*).

Celkem bylo během 21 let (2002–2023) ve Fakultní nemocnici Olomouc diagnostikováno 328 pacientů s potvrzenou diagnózou MDS, kdy metodou FISH s rutinním panelem sond (*MetaSystems*) byla aberace chromosomu 5 detekována u 111 pacientů (34 %). Nález 5q- byl prokázán u 44 pacientů (13 %) a telomerická del(5q) pak byla nalezena pouze u jediné pacientky.

Retrospektivní analýza provedená metodou arrayCGH na vzorcích DNA 44 pacientů z doby diagnózy prokázala nebalancované aberace oblasti 5q u 42 pacientů. ArrayCGH umožnila detekovat CDR o velikosti 1,8 Mb nacházející se v oblasti 5q32.1 (obsahuje 39 genů). Největší deletovaná oblast zaujímalá 86,13 Mb. Nálezy dalších přídatných aberací metodou arrayCGH vedly k vyřazení 2 pacientů ze souboru pacientů s 5q-.

Pomocí MPS byly analyzovány vzorky 42 pacientů, z nichž 29 pacientů mělo alespoň jednu variantu ve sledovaných genech. Nejčastěji mutovaným genem byl *SF3B1* (14 pacientů), a to zejména varianta K700E. U jednoho pacienta byla nalezena varianta *DDX41* s nejistým významem. U 5 pacientů byl mutován gen *TP53*. U 13 pacientů došlo k progresi onemocnění do sAML, ale nepodařilo se jednoznačně identifikovat žádné jasné prediktory.

Kombinace cytogenetických a molekulárně-cytogenetických metod je přínosná pro správnou diagnostiku a stratifikaci pacientů s MDS. V současné době je však pro přesnou diagnostiku tohoto onemocnění nezbytné použití metod MPS.

Podpořeno grantem: IGA_LF_2024_001.

Cytogenomická analýza aberací chromosomu 7 u myeloidních malignit

Kristina Rochlová¹, Marie Valeriánová¹, Iveta Mendlíková¹, Libuše Lizcová², Lenka Pavlišťová², Johana Richterová¹, Margita Vrzáková¹, Jaroslav Čermák¹, Jan Válka¹, Anna Jonášová³, Zuzana Zemanová² a Šárka Ransdorfová¹

¹ Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

² Centrum nádorové cytogenomiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK v Praze

³ 1. interní klinika-klinika hematologie, VFN a 1. LF UK, Praha

Aberace chromosomu 7 patří mezi rekurentní chromosomové změny u myeloidních malignit, jako jsou myelodysplastické syndromy (MDS) a akutní myeloidní leukémie (AML). Jejich studium přispívá k rozšíření znalostí o etiologii a progresi nádorových onemocnění.

Cílem studie bylo mapování zlomových míst a aberací chromosomu 7 pomocí cytogenomických a molekulárně cytogenetických metod.

V letech 2017–2024 jsme vyšetřili celkem 177 vzorků kostní dřeně nově diagnostikovaných dospělých nemocných s MDS/AML, u kterých jsme našli aberaci chromosomu 7. U 24 pacientů (14 %) jsme detekovali izolovanou monosomii chromosomu 7. Samostatnou delecí dlouhých ramen chromosomu 7 jsme prokázali u 6 nemocných (3 %). Alteraci chromosomu 7 v kombinaci s další změnou mělo 29 nemocných (16 %). 118 pacientů (67 %) mělo aberace chromosomu 7 jako součást komplexního karyotypu. U 92 nemocných jsme prokázali delecí 7q, z toho u 44 pacientů došlo ke ztrátě tumor supresorového genu *EZH2* (7q36.1). Změny na krátkých ramenech jsme nejčastěji lokalizovali v oblasti 7p12, kde se nachází gen *IKZF1*, jehož delecí jsme potvrdili u 21 pacientů. U 13 nemocných jsme zaznamenali delecí všech námi vyšetřovaných oblastí 7q22, 7q31 i 7q36.

Alterace chromosomu 7 se nejčastěji objevovala jako součást komplexních přestaveb. Současně jsme potvrdili značnou heterogenitu zlomových míst, a to jak na krátkých, tak dlouhých ramenech. Všechny tyto změny jsou spojeny se špatnou prognózou a rychlou progresí onemocnění. Jejich včasná detekce je proto zásadní pro správné vyhodnocení prognostického rizika nemocných a výběr odpovídající terapie.

Podpořeno projekty MZČR00023736 a RVO-VFN64165.

Marker chromozom u pacienta s nespecifickou stigmatizací a opožděným psychomotorickým vývojem

Buržáková K., Černá D., Balcar A., Grečmalová D., Širůčková S., Valečková J., Kaniová R., Novotná R., Brychová L., Ďurechová K., Dolinková M.

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

Úvod: Malé nadpočetné marker chromozomy (sSMC) jsou strukturálně abnormální chromozomy, jejichž původ nelze jednoznačně určit klasickým G-pruhováním. Často se vyskytují v mozaikách. Jejich detekce a charakterizace je důležitá pro diagnostiku genetických poruch, přestože nejsou vždy spojeny s klinickými příznaky. Vyskytují se u 0,043 % novorozenců a u 0,426 % pacientů s mentálním postižením. V posteru představujeme pacienta s nespecifickou stigmatizací a opožděným psychomotorickým vývojem, u něhož byl detekován marker chromozom v mozaice.

Materiál a metody: V novorozeneckém věku byl stanoven karyotyp + SNP/CGH array z periferní krve (na jiném pracovišti). Ve věku 4 let byl znovu stanoven karyotyp z periferní krve (FN Ostrava). Ve věku 10 let byl odebrán kožní štěp z ušního boltce (během operace odstávajících uší) s následnou kultivací buněk a izolací DNA pro stanovení karyotypu, SNP array a NGS test (FN Ostrava).

Výsledek: Stanovení karyotypu novorozence z periferní krve na jiném pracovišti: karyotyp se 17% mozaikou sSMC. Vyšetření metodou SNP/CGH array mozaiku marker chromozomu nepotvrdilo. Ve Fakultní nemocnici Ostrava byl opakovaně stanoven karyotypu z periferní krve: karyotyp s 3% mozaikou sSMC. SNP array nebyla vzhledem k nízkému zastoupení linie s marker chromozomem indikována. Stanovení karyotypu z kožního štěpu: karyotyp se 62% mozaikou sSMC. Na základě tohoto nálezu bylo indikováno vyšetření SNP array a byla detekována cca 50% mozaika duplikace oblasti 17p11.2q21.1 (cca 21,0 Mb, 411 genů databáze HGNC, 202 genů databáze OMIM). NGS panel mikrocefalie neodhalil žádnou patogenní sekvenční variantu (678 genů).

Závěr: Duplikace oblasti 17p11.2 odpovídá syndromu Potocki Lupski, který zahrnuje neprospívání, opožděný PMV, neurovývojovou problematiku, nespecifickou stigmatizaci. Duplikace oblasti 17q11.2 (gen neurofibromin) nemá charakter klasické neurofibromatózy, manifestuje se jako neurovývojová porucha. Duplikace oblasti 17q12 odpovídá 17q12 duplikačnímu syndromu, dominuje neurovývojová problematika včetně epilepsie a psychiatrických změn. Diagnóza byla určena až po odebrání vzorku kožního štěpu z ušního boltce. Nalezený marker chromozom vznikl *de novo*, riziko opakování pro další těhotenství není zvýšené nad obecné populační riziko.

Variabilita klinických nálezů u pacientů se CNV oblasti 2q13

Mikošková A., Ďurechová K., Černá D., Valečková J., Balcar A., Kaniová R., Novotná R., Grečmalová D.

Ústav klinické a molekulární patologie a lékařské genetiky, FN Ostrava

Úvod: Delece a duplikace v oblasti 2q13 jsou v populaci vzácné, vznikají de novo nebo jsou AD dědičné. CNV na chromozomu 2 jsou spojovány s množstvím různých patologických stavů, např. neurovývojovými poruchami, poruchami chování, kostními dysplaziemi, malignitami a dalšími.

Rekurentní varianty oblasti 2q13 byly nalezeny u pacientů s poruchou autistického spektra v rozsahu genů *NPHP1* (*607100) a *MALL* (*602022) nebo společně s geny *RGPD6* (*612709) a *BUB1* (*602452) jako příčina širší fenotypové manifestace ve smyslu kognitivního deficitu, neuropsychiatrické symptomatologie, poruch motorické koordinace, někdy i VVV (srdce, ledviny)⁵. Výrazným rysem je neúplná penetrance, rodiče pacientů mohou být i bezpříznakovými nosiči.

Metody: Celogenomová SNP array byla provedena pomocí kitů HumanCytoSNP-12 v2.1 Analysis Beadchip a HumanCytoSNP-850K v1.3 DNA Analysis Beadchip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Získaná data byla zpracována pomocí softwaru BlueFuse Multi (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Nálezy byly ověřeny metodou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) pomocí soupravy SALSA MLPA P387 NPHP1 na genetickém analyzátoru ABI3130. Pro analýzu dat získaných metodou MLPA byl použit software Coffalyser (MRCHolland).

Výsledek: V letech 2015–2024 bylo metodou SNP array vyšetřeno 2000 pacientů, u 15 pacientů byly zjištěny delece nebo duplikace oblasti 2q13 (0,75 %). U 10 pacientů se jednalo o deleci a u 5 pacientů o duplikaci této oblasti. U pacientů mladších 1 roku nebylo možné klinické znaky zhodnotit. Další genetické změny byly přítomny u 5 pacientů, u 10 pacientů se jednalo o jedinou nalezenou změnu.

Shrnutí: Byla potvrzena vysoká variabilita klinických projevů variant oblasti 2q13. Výrazný rozdíl byl zaznamenán i ve srovnání klinických projevů mezi delecemi a duplikacemi. V obou skupinách byly přítomny: porucha řeči, opoždění vývoje, stigmatizace, hypotonie a epilepsie, zatímco ADHD, PAS a oční vady byly zaznamenány jen u pacientů s delecí. U pacientů s duplikací byly navíc zjištěny kostní dysplazie a malý vzrůst. Tyto nálezy jsou ve shodě s dostupnou literaturou. Makrocefalie, mikrocefalie nebo vrozené srdeční vady, které jsou také uváděny v odborných člancích³, nebyly u našich pacientů zjištěny, pravděpodobně z důvodu malého souboru pacientů.

U všech pacientů s duplikací byl rozsah srovnatelný - 95,1 kb až 119 kb. Rozsah delecí vykazoval větší variabilitu - 107 kb až 942,9 kb (1 až 7 OMIM genů). Gen *NPHP1* byl deletován nebo duplikován u všech 15 pacientů, ve 14 případech společně s genem *MALL*. Gen *NPHP1* lokalizovaný v oblasti 2q13 kóduje protein nefrocystin, který funguje při kontrole buněčného dělení a má signalizační funkci při mezibuněčných interakcích. Mutace v genu *NPHP1* jsou popisovány u AR dědičné juvenilní nefronoftizy (#256100) a u Joubertova syndromu-4 (#609583). Gen *MALL* kóduje protein s transportní funkcí v endoteliálních buňkách a je lokalizován zejména v glykolipidových a cholesterolem bohatých membránách. CNV genu *NPHP1* byly původně referovány jako benigní varianty, v současnosti jsou hodnoceny jako varianty nejjasného klinického významu.

Rok s VeriSeq NIPT v GNTlabs

Sheardová J., Čadová P., Bich Nguyen Thi Ngoc L., Zembol F., Dvořáčková H., Šuhajová S., Stejskal D., Bittóová M., Koudová M. GNTlabs by GENNET, jessica.sheardova@gennet.cz

Úvod: VeriSeq NIPT Solution v2 je IVD test určený ke screeningu chromozomálních aberací plodu z periferní krve těhotných žen od 10. gestačního týdne. S využitím WGS je kromě záchytu aneuploidií všech chromozomů schopen i detekce částečných autozomálních duplikací a delecí (CNVs) ≥ 7 Mb. Přechodu na tuto CE-IVD metodu v GNTlabs předcházely dvoutřídňový „competency testing“ s analýzou dat a validací od společnosti Illumina®. Od září 2023 jsme touto metodou provedli více než 2700 NIPT. NIPT je v GENNET komerčně nabízen pod značkou PRENASCAN.

Materiál, metody: Prvním krokem NIPT vyšetření je separace plazmy ze vzorku periferní krve matky. Jeden experiment zahrnuje obvykle 48 vzorků. Následuje zhruba osmihodinový automatizovaný proces izolace cfDNA a přípravy knihovny pomocí přístroje VeriSeq NIPT Microlab STAR (Hamilton®). Celogenomové sekvenování pomocí přístroje NextSeq 550Dx trvá ~16 hodin, navazující datová analýza je plně automatizovaná a probíhá na serveru VeriSeq Onsite Server v2. V rámci verifikace výsledků a případného záchytu CNVs < 7 Mb je v GNTlabs využíván i software *Wisecondor X* (Gentská univerzita).

Výsledek: K dnešnímu dni byla metodou VeriSeq NIPT detekována aberace u 66 těhotných žen (2,4 % z celkového počtu vyšetření). Nález proporcionalně téměř z jedné čtvrtiny (24,2 %) zahrnovaly trizomii 21 nebo CNV nebo aneuploidie pohlavních chromozomů nebo RAA (rare autosomal aneuploidies), z nichž se ve více než 50 % jednalo o T7, která se ukazuje být typicky placentární mozaikou s rizikem IUGR plodu. Z celkového počtu NIPT selhalo pouze 1,2 % testů, což odpovídá výrobcem deklarovaným limitům. Po opakovaném odběru krve však bylo i v těchto případech v 65 % dosaženo validního výsledku.

Kazuistika 1

Abnormální výsledek NIPT může výjimečně upozornit na onkologické onemocnění matky. 27letá pacientka s negativním výsledkem screeningu v I. trimestru se v 15. týdnu gravidity rozhodla pro PRENASCAN, který detekoval opakovaně z různých odběrů krve mnohočetný chromozomální nález: dup(2)(p25.1p11.2);-4;+5. Následně provedená aminocentéza a SNP array vyšetření plodu i obou rodičů prokázalo u plodu uniparentální izodizomii chromozomu 6 maternálního původu (iUPD(6)mat), která byla posléze potvrzena i ze vzorku placenty po porodu. V průběhu těhotenství a po porodu byla pacientka na základě výsledku NIPT hemato-onkologicky vyšetřována a sledována, po porodu jí byla odstraněna zvětšená uzlina na krku, z níž byl histologicky diagnostikován Hodgkinův lymfom a byla zahájena chemoterapie.

Kazuistika 2

Pacientka s negativním výsledkem screeningu v I. trimestru se rozhodla pro PRENASCAN. Provedený VeriSeq NIPT byl negativní. Sekundární analýzou CNVs pomocí softwaru *Wisecondor X* byla zachycena mikrodelece 22q11.21 o vel. 4,8 Mb (781 kb dle násl. provedené array CGH), nedetekovatelná samotným VeriSeq testem. Tato mikrodelece je součástí kritické oblasti DiGeorge syndromu, z tohoto důvodu byla na jiném genetickém pracovišti indikována aminocentéza a provedeno array CGH vyšetření plodu i obou rodičů, které prokázalo, že plod tuto delecii zdědil po své klinicky zdravé matce, která se proto rozhodla v graviditě pokračovat.

Intrachromozomová triplikace či nadbytečný chromozom? Kazuistika

Schreiberová L¹, Žmolíková J¹, Pitronová S¹, Neščáková N¹, Skalíková R¹, Konvalinka D¹, Smolíková M¹, Trombik I¹, Trombik L¹, Lazarová A¹, Maier J¹, Kopečková J¹, Hagenová M¹, Všetická J², Uvírová M¹

¹ EUC laboratoře CGB a.s.

² Genetika Ostrava s.r.o.

Chromozom 15 je náchylný ke strukturním aberacím, asi polovina marker chromozomů je původem z chromozomu 15. Významnou instabilitu vykazuje zvláště region 15q11-q14. Zde se nachází 5 shluků repetitivních sekvencí, které jsou podstatou rekurentních zlomových míst známých jako BP1-BP5. Je zde také lokalizován např. Prader-Willi/Angelman kritický region, jehož delece způsobují charakteristické projevy těchto syndromů. Duplikace a triplikace regionu 15q11-q14 mívají variabilní klinické projevy.

U dvouletého chlapce s poruchou motoriky, řeči, epilepsií, hypotonií a mozkovou obrnou byla pomocí metody arrayCGH nalezena triplikace o velikosti 10,39 Mb v oblasti 15q11.2q13.3. Vzhledem k tomu, že v literatuře je popisována podobnost fenotypových projevů pacientů s intrachromozomovou triplikací a pacientů s idic(15), byla také u probanda a rodičů provedena klasická cytogenetická analýza. U probanda byla nalezena 90% mozaika mužského karyotypu s nadbývajícím isodicentrickým (nebo pseudoisodicentrickým) chromozomem 15 a normálního mužského karyotypu. FISH metodou byla na tomto derivovaném chromozomu potvrzena přítomnost dvou kopií genu *SNRPN* (lokus pro Prader-Willi/Angelman region) v 92% mozaikové formě.

V literatuře je popisován fenotyp pacientů s triplikací 15q11-q13 jako obecně méně závažný a variabilnějšího charakteru než fenotyp pacientů s idic(15). Správná diagnostika je tedy nezbytná pro včasnou intervenci a budoucí správnou terapii a je nezbytné vzít v úvahu i možnost chromozomových aberací detekovatelných klasickou cytogenetickou analýzou.

Zdánlivě shodná strukturní přestavba 8p v karyotypu dvou pacientek s opožděním vývoje.

Slámová, Z., Drábová, J., Vyhnálková, E., Laššuthová, P., Vosecká, T, Řezáčová, H., Kutilová, T., Palánová, M., Moučková, H., Novotná, D.

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

Úvod: Invertovaná duplikace s přilehlou terminální delecí krátkého raménka chromozomu 8 – inv dup del(8p) je vzácná komplexní chromozomová přestavba relativně snadno rozpoznatelná při karyotypování díky své specifické a do jisté míry konstantní struktuře. Přestavba je doprovázena variabilním fenotypem, mezi jehož znaky dominuje PMV a opoždění řeči.

Cíl: Prezentujeme případy dvou pacientek s postižením fenotypu se zdánlivě shodným nálezem strukturní přestavby v oblasti krátkých ramen chromozomu 8 připomínající strukturu inv dup del(8p), u nichž byla dalšími metodami zjištěna různá povaha přestavby i mechanismus jejího vzniku.

Materiál a metody: Probandka A vykazovala opožděný PMV, hypotonii, absenci řeči, rysy PAS, KFD a dysgenesis corpus callosum. U probandky B byl pozorován opožděný PMV a opoždění vývoje řeč, dále mírná KFD. U probandek bylo provedeno karyotypování na kultivovaných lymfocytech z periferní krve a zjištěná přestavba 8p byla dále upřesněna metodou array CGH s využitím DNA izolované z periferní krve. Probandka B byla dále vyšetřena metodou FISH. U rodičů probandek bylo následně provedeno stanovení karyotypu pro ověření původu přestaveb.

Výsledek: Výsledkem karyotypování u obou probandek byl nález derivovaného chromozomu 8 se suspekci na inv dup del(8p). Vyšetření array CGH u probandky A potvrdilo duplikaci oblasti 8p23.1p11.21 v rozsahu 29,2 Mb a delecí v oblasti 8p23.3p23.1 s rozsahem 6,9 Mb typickým pro invertované duplikace s delecí. U probandky B byla zjištěna shodná delece jako u probandky A, avšak nadbytečný materiál na 8p v rozsahu 24,4 Mb pocházel z oblasti 3p26.3p24.2 a jednalo se tedy o derivát nebalancované translokace t(3;8)(p24.2;p23.1), což bylo potvrzeno vyšetřením FISH. Vyšetřením rodičů probandek byl stanoven *de novo* původ obou aberací.

Závěr: U probandek byla navzdory stejnému výsledku z karyotypu prokázána odlišná strukturní přestavba, což dokládá nezbytnost kombinace různých diagnostických metod pro plné objasnění aberace. Ačkoli má přestavba u obou dívek jiný charakter a mechanismus vzniku, sdílejí shodný nález terminální delece 8p, patrně vlivem přítomnosti segmentálních duplikací v oblasti zlomového místa. Oblast delece 8p23.1→pter je považována za kritickou oblast spojenou s autismem, opožděným vývojem řeči a epilepsií. Fenotyp probandek je dále ovlivňován duplikovanými oblastmi přestaveb.

Podpora: Podpořeno projektem koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203.

Nový etnický polymorfismus nebo jen náhoda?

Vosecká T., Řezáčová H., Slámová, Z., Drábová, J., Kutilová, T., Štolfa M., Peldová P., Zoubková V., Novotná D.

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

Úvod: Gen *NEXN* (MIM:613121; NM_144573.4) ležící v oblasti 1p31.1 kóduje protein, který se podílí na buněčné adhezi a migraci. Heterozygotní patogenní varianty tohoto genu jsou asociovány s AD dilatační (#613122) a hypertrofickou kardiomyopatií (#613876). Většina případů dilatačních kardiomyopatií vykazuje variabilní expresivitu a neúplnou penetranci [McNally and Mestroni, 2017].

Materiál a metody: Prezentujeme tři pacienty, dva s fenotypem dilatační kardiomyopatie a jednoho pacienta se suspektní alveolokapilární dysplázií (ACD), respiračním selháním a pigmentovými névy, u nichž byla metodou CES detekována delece proximální oblasti genu *NEXN*. K ověření a upřesnění nálezu byla použita metoda array CGH s využitím platformy „kardio“ aCGH + SNP 4x180K, jejíž diagnostické sondy jsou navrženy tak, aby pokrývaly geny (exonové pokrytí) související s VVV srdce. Vyšetření pomocí kardioarraye bylo dále provedeno i u rodinných příslušníků pacientů pro stanovení rizika a určení původu aberace.

Výsledky: Vyšetření prokázalo u dvou ze tří pacientů identickou heterozygotní intragenovou deleci genu *NEXN* (MIM: 613121; NM_144573.4) v oblasti 1p31.1 o velikosti ~2,1 kb zasahující s určitostí exony 2 až 4 a pravděpodobně také exon 5 (nelze upřesnit vzhledem k rozložení sond). U třetího probanda byla prokázána identická delece, avšak ležící v oblasti se ztrátou heterozygosity (homozygotní delece).

Závěr: Vyšetřením tří pacientů a jejich rodinných příslušníků metodou array CGH jsme ověřili přítomnost identické intragenové delece v genu *NEXN*. Zajímavé je, že ve všech případech se jedná o rodiny romského původu s výskytem ztráty heterozygotnosti hraničně velkého rozsahu. Je tedy možné, že se jedná o variantu typickou právě pro romskou populaci vyskytující se na území České republiky. Otázkou zůstává, zda jsme odhalili další etnický polymorfismus nebo jde o náhodné nálezy?

Podpora: Podpořeno projektem koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 a AZV 17-29423A.

Nález čtyřnásobné trizomie v mozaice – kazuistika

Hana Kučerová, Klára Rozehnalová, Lenka Hřčková, Hedvika Tůmová, Klára Bobková, Václav Sebroň, Romana Mihalová

ÚBLG 1. LF UK a VFN v Praze, Klinika gynekologie, porodnictví a neonatologie 1. LF UK a VFN

Úvod: Prezentujeme kazuistiku dítěte, chlapce, který byl předčasně narozený, těžce hypotrofický po porodu císařským řezem v celkové anestezii matky pro těžkou FGR a centralizaci oběhu plodu. Chlapec měl opakované infekty, hepatomegalii a cholestatickou hepatózu. Podávána transfuze a opakovaně ATB.

Po třech měsících na oddělení Perinatologického centra gynekologicko-porodnické kliniky U Apolináře dochází k rozvoji multiorgánového selhání a rozvratu vnitřního prostředí, exitus letalis 91. den života.

Před úmrtím byly odebrány vzorky krve na genetická a metabolická vyšetření.

Cíle a metodika: Do cytogenetické laboratoře byly zaslány vzorky s indikovaným vyšetřením karyotypu a microarray.

Výsledky: Karyotyp byl standardně zhodnocen z deseti mitóz strukturně, preparát byl vzhledem k věku a stavu (zaléčení antibiotiky) pacienta poměrně nekvalitní, delších mitóz bylo velmi málo, při maximální rozlišovací schopnosti 400–500 bp byl nejprve stanoven normální mužský karyotyp. Vyšetření metodou microarray přineslo nález mozaicistní trizomie u čtyř chromozomů – 8, 13, 17 a 18. V karyotypu bylo zhodnoceno numericky dalších 50 mitóz s velmi nízkou rozlišovací schopností a byla potvrzena současná trizomie čtyř chromozomů v mozaice.

Závěr: Vyšetření metodou microarray odhalilo přítomnost trizomie čtyř chromozomů v mozaice, následné dovyšetření karyotypu tento nález potvrdilo. Jednalo se o velmi raritní a neočekávaný nález 20–30 % mozaiky současné trizomie čtyř chromozomů 8, 13, 17 a 18.

57. Výroční cytogenomická konference. Sborník abstraktů

Editorka: prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

1. elektronické vydání, Brno 2024

ISBN 978-80-280-0586-3

Vydala Masarykova univerzita, Žerotínovo nám. 617/9, 601 77 Brno



www.cytogenomika2024.cz

MUNI
PRESS