Moderní metody analýzy genomu a význam pro hematologii

Ing. Zuzana Vrzalová, Ph.D.

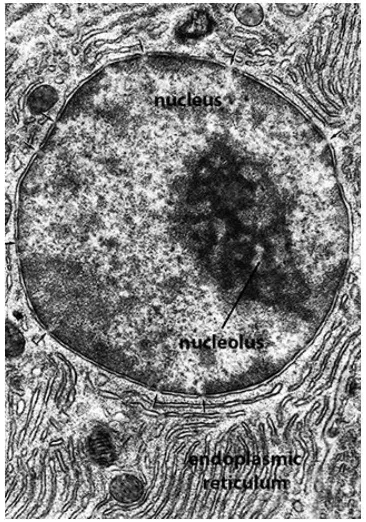
- Přerov
- 1994 - 1997 Gymnázium
- 1997 - 2002 VŠCHT Praha - magisterské studium - biochemie a technologie v chemii a potravinářství
- 2003 - 2004 Univerzita Hohenheim – Stuttgart – stipendijní program
- 2005 - 2013 FN Brno – CMBG – Sekce metabolických nemocí
- 2010 - 2017 MU Genomika a proteomika – Ph.D.
- 2017 – dosud Centrum molekulární medicíny - CEITEC MU (Prof. Pospíšilová)

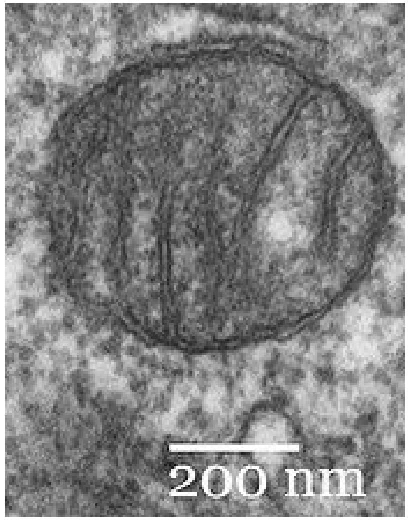
  Centrum molekulární biologie a genetiky – IHOK FN Brno

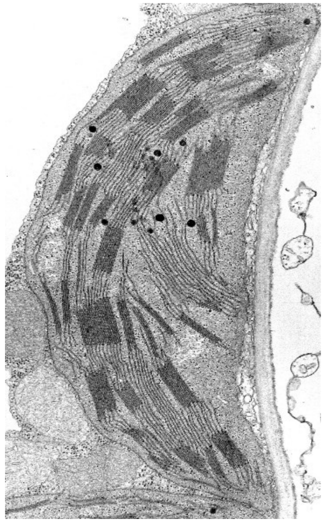
  (Prof. Pospíšilová, Prof. Doubek)

Genom

- Veškerá genetická informace uložená v DNA konkrétního organismu
  - Jaderná DNA
  - Mitochondriální DNA
  - Plastidová DNA (pouze u ✿ ❀ ❁)

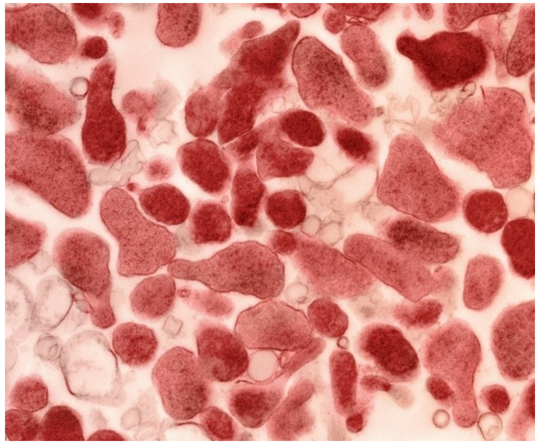






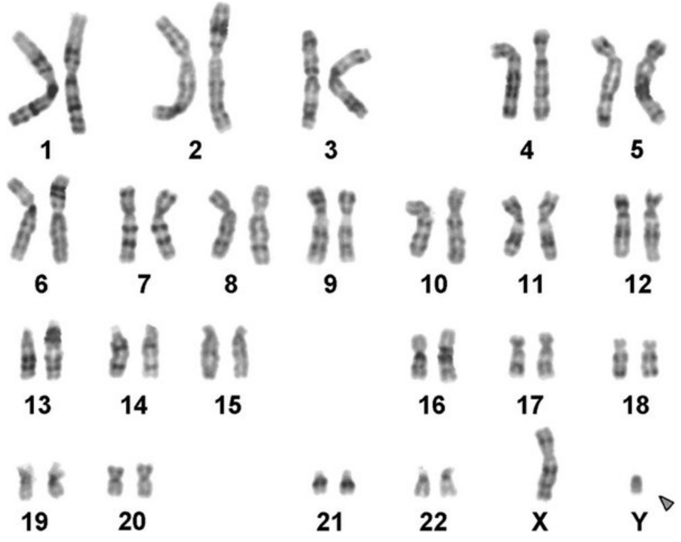
Velikost genomu

- Udává se v bp = páry bazí …….(kb, Mb)
- ~~„čím složitější organismus, tím větší genom“~~
- Nejmenší genom: *Mycoplasma genitalium* – 580 tisíc bp
- Největší genom: měňavka *Polychaos dubium* – 670 miliard bp
- <u>Člověk: 3,2 miliard bp</u>



Lidský genom

- Jaderný genom
  46 chromozomů:
  - 22 párů chromozomů
    + pohlavní chromozomy
    XX (žena) nebo XY (muž)



kapradina Hadilka
(Ophioglossum)
- až 1260 chromozomů

octomilka *(Drosophila melanogaster)*
8 chromozomů

huseníček rolní
(Arabidopsis thaliana)
10 chromozomů

MUNI

Lidský genom

- **genom** = $3.2 * 10^9$ bp

~ 20 000 genů

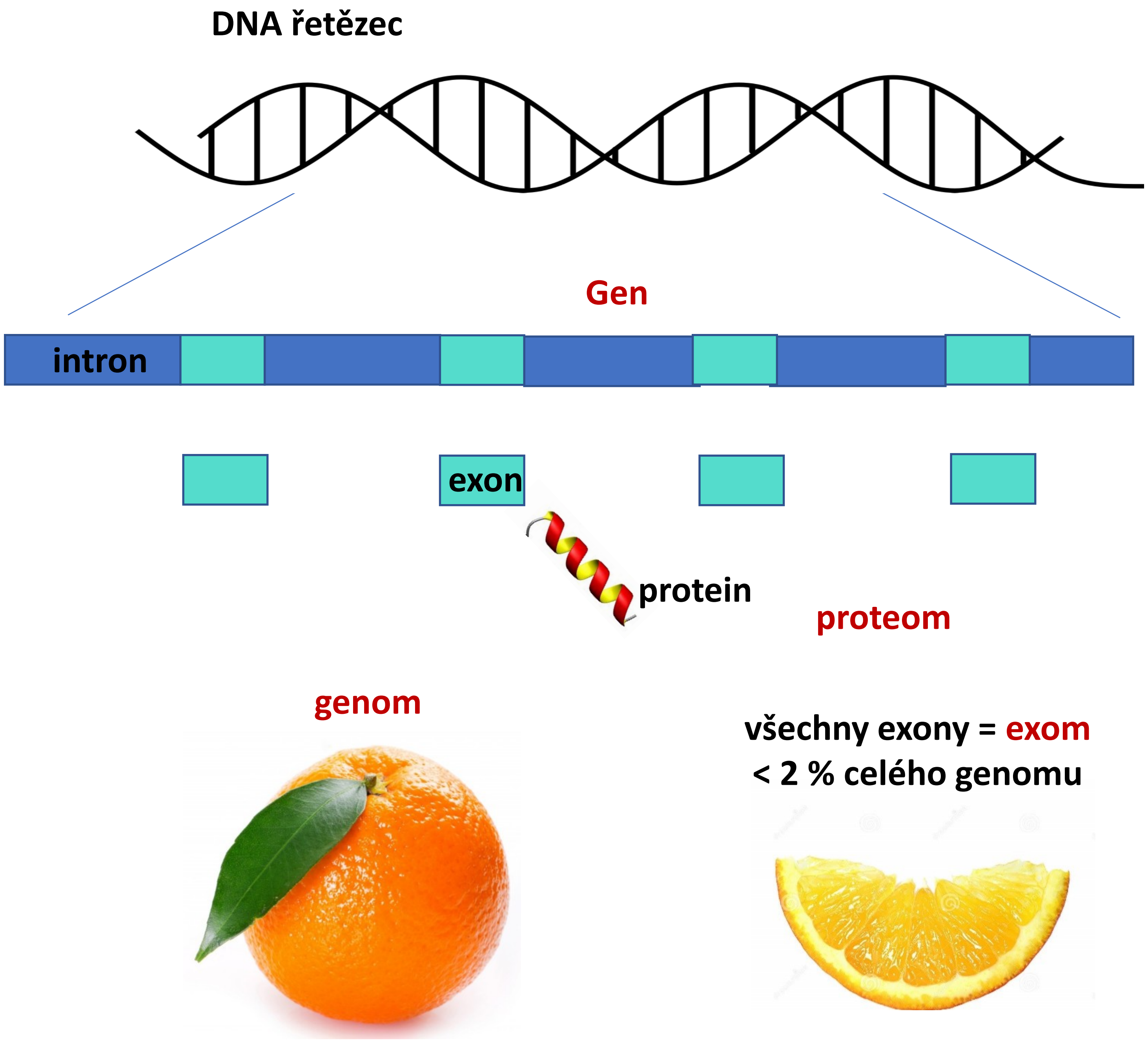
~ nekódující části, sekvence

- **exom** = souhrn exonů

~ 1,5 % genomu

- **proteom** = souhrn proteinů

~ 10 000 proteinů



Lidský genom

- lidský **genom**

= 3.2 * 10^9 bp

~ 20 000 genů

Počty genů – komplexita organismu

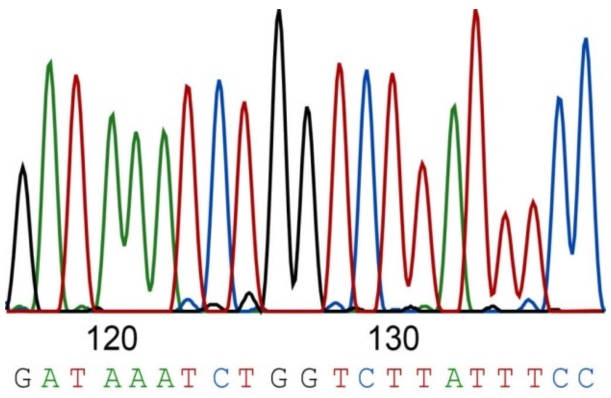
- **Exom** = < 2 % lidského genomu

obsahuje ~ 85 % známých mutací podmiňujících onemocnění

Geneticky podmíněná onemocnění u člověka

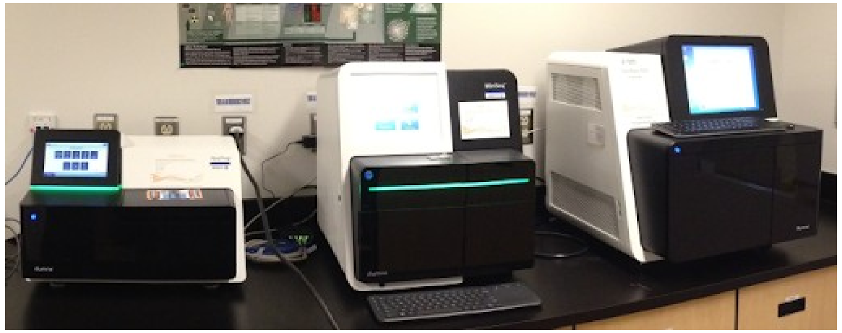
- Monogenní choroby
- Chromozomové aberace
- Genetické poruchy somatických buněk (nádory)
- Choroby s nemendelistickým způsobem dědičnosti (např. nestabilní opakování trinukleotidů)
- Polygenní choroby
- Multifaktoriální choroby (geny + prostředí)

Sekvenování – využití v diagnostice



- Zejména 1. generace (Sangerovo sekvenování)
  - Zlatý standard
  - Sekvenování genů (resp. jejich částí)

- 2. (nová) generace čím dál více rozšiřuje své uplatnění
  - Sekvenování velkého množství genů
  - Sekvenování jednoho genu více pacientů
  - Sekvenování exomu (DNA, která kóduje proteiny)
  - Sekvenování genomu (veškerá DNA v buňkách)



MUNI

2. generace NGS – flexibilita

Celý genom

3 200 000 000 bp
30-50 x pokrytí

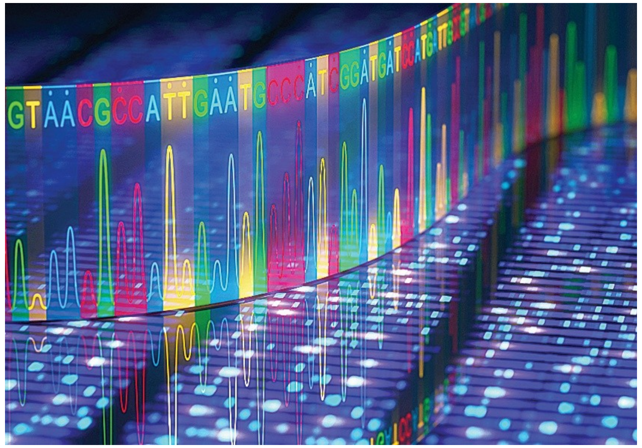
Exom

18 000 - 20 000 genů
100 x pokrytí

Konkrétní geny nebo tzv. „hot spots“

< 100 genů
> 1000 x pokrytí

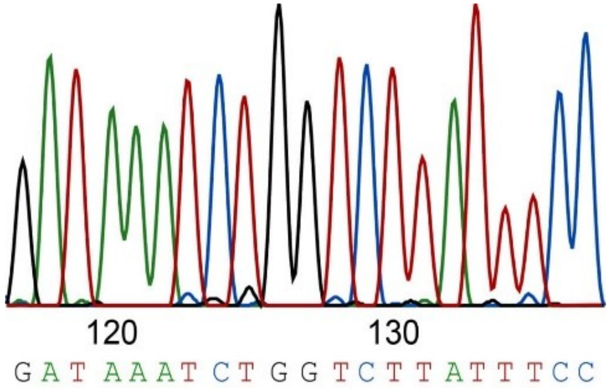
Sekvenační metody analýzy DNA



1. *Sangerovo sekvenování*
2. *Panelové sekvenování – target NGS*
3. *Celoexomové sekvenování*
4. *Celogenomové sekvenování*

odhalení příčiny nejrůznějších nemocí

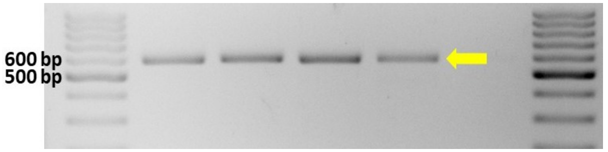
1. Sangerovo sekvenování - klasické sekvenování

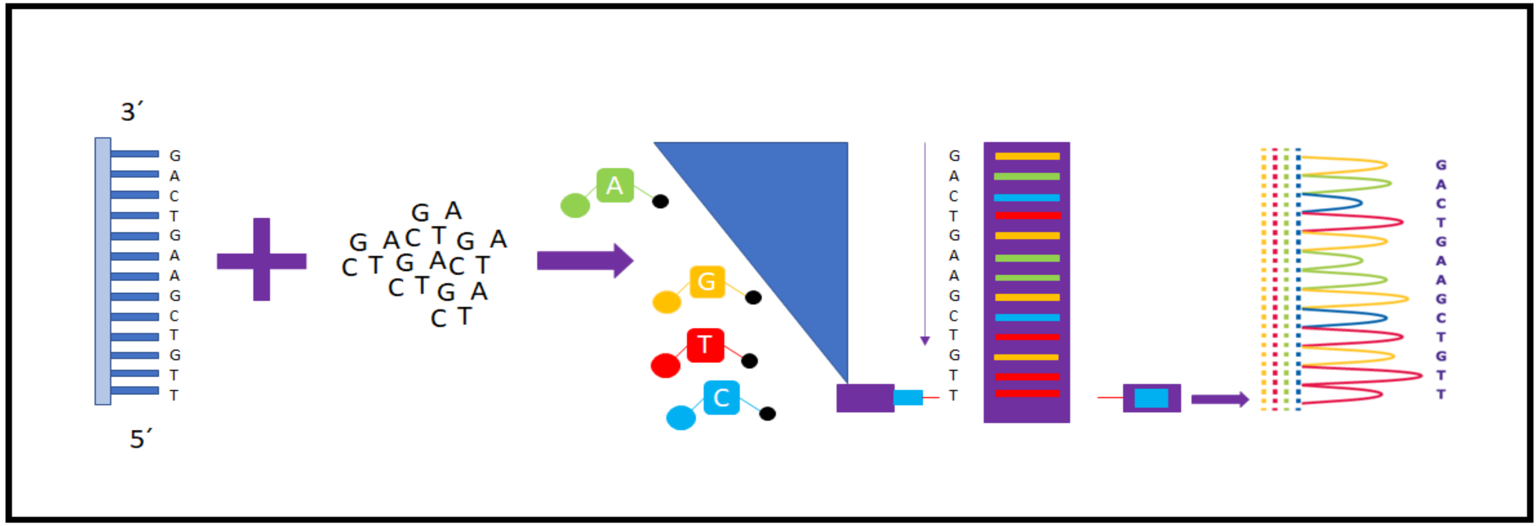


- sekvenace nukleových kyselin, proteinů
- 1977 – biochemik Frederick Sanger
- 1980 – udělena Nobelova cena za chemii

➢ **slouží k detekci SNV a krátkých delecí a inzercí**

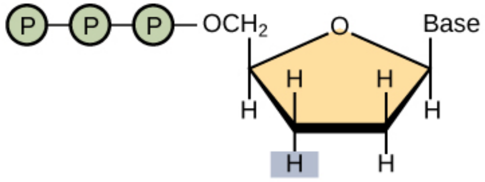
1. **Polymerázová řetězová reakce (PCR)**
2. **Elektroforéza**



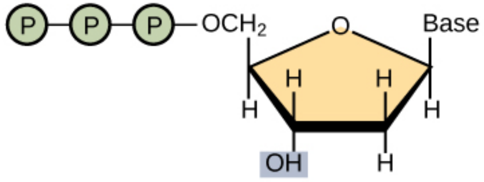


1. Sangerovo sekvenování - klasické sekvenování

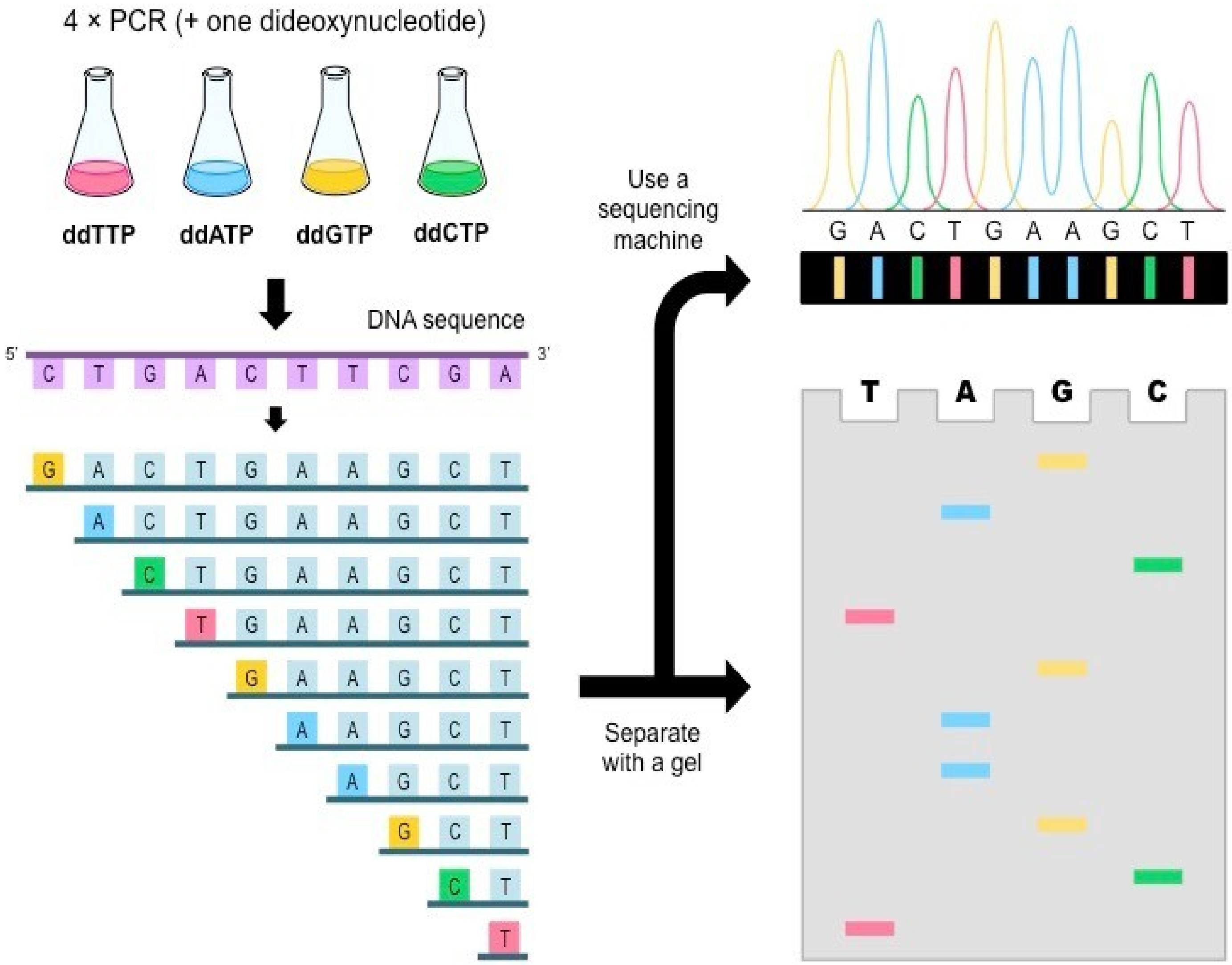
3. Značící reakce
4. Sangerovo sekvenování



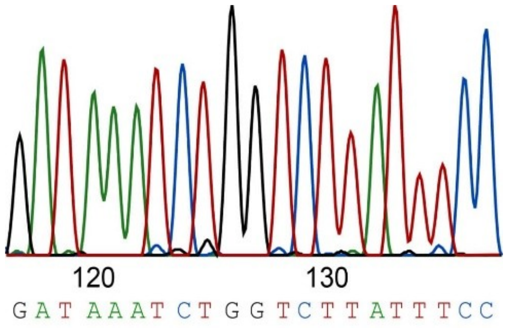
Dideoxynucleotide (ddNTP)



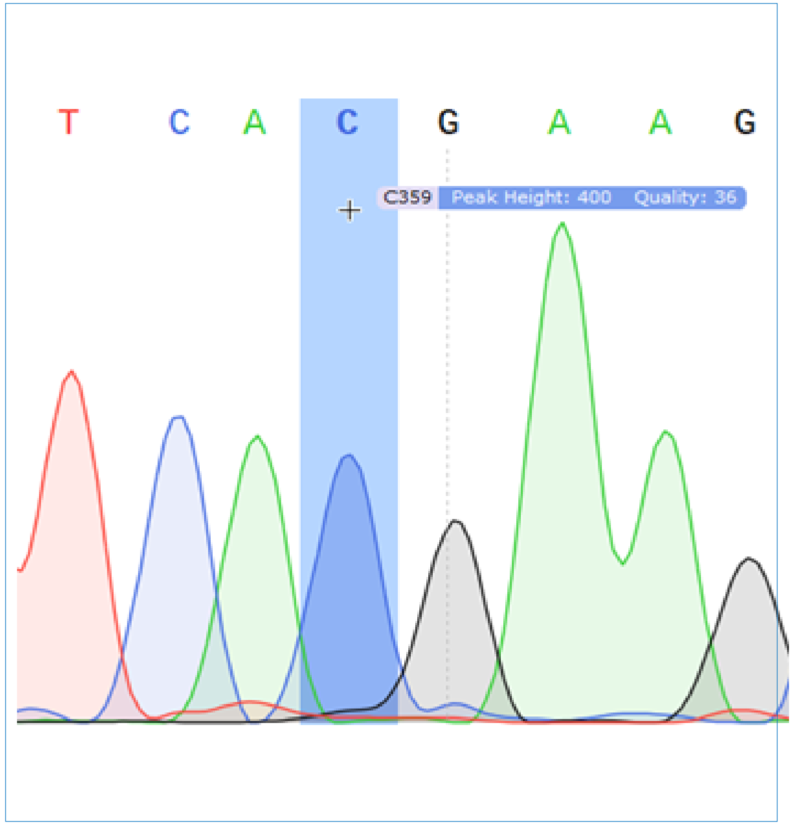
Deoxynucleotide (dNTP)



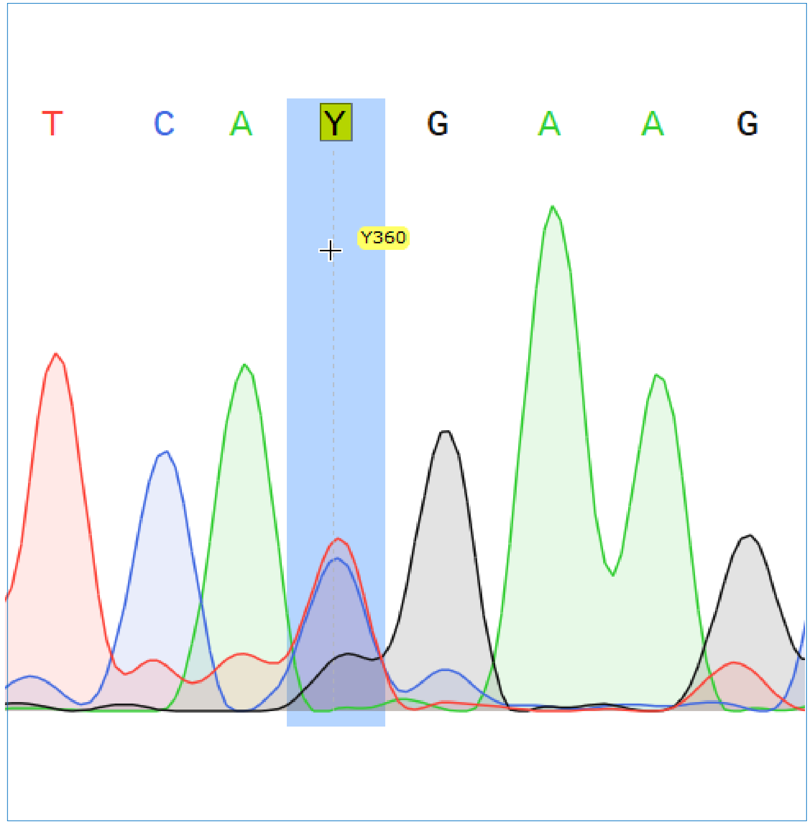
Ověření pomocí Sangerova sekvenování



(Zdroj obrázků: vlastní)

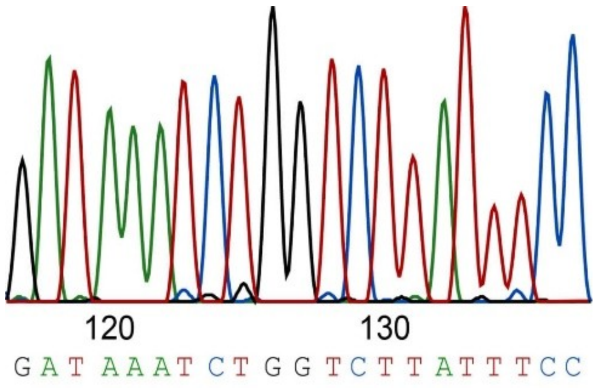


Zdravý člen rodiny



Nemocný člen rodiny
s heterozygotní substitucí

Kam směřuje Sangerovo sekvenování



- pochopení struktury a fce NK a proteinů
- postupně nahrazeno přístupy NGS
- detekční metoda u geneticky podmíněných onemocnění:
  „krátké" geny (talasémie), hot spot (specifické, cílové) oblasti
- ověření každé pravděpodobné kauzální varianty z NGS
- detekce kauzální varianty u dalších příbuzných

➢ **slouží k detekci SNV a krátkých delecí a inzercí**

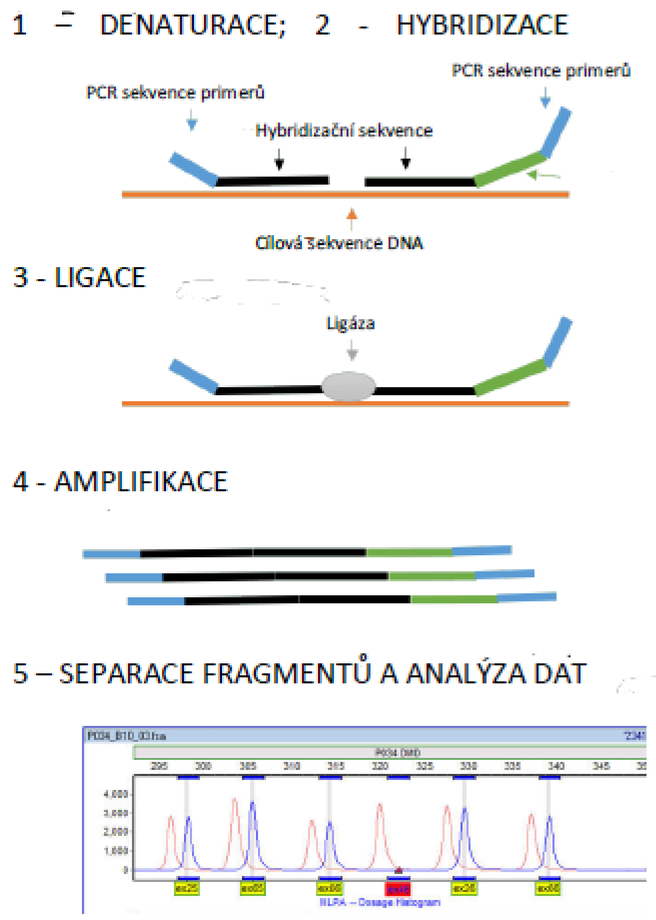
MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

- izolovaná DNA

- **detekce CNV (variant v počtu kopií):**
  parciální i rozsáhlé delece a duplikace

- firma: MRC Holland, přes 300 komerčních kitů
- multiplex PCR esej
  do plastid u rostlin
- kvantifikace – kapilární elektroforéza
- online dostupný software Coffalyser

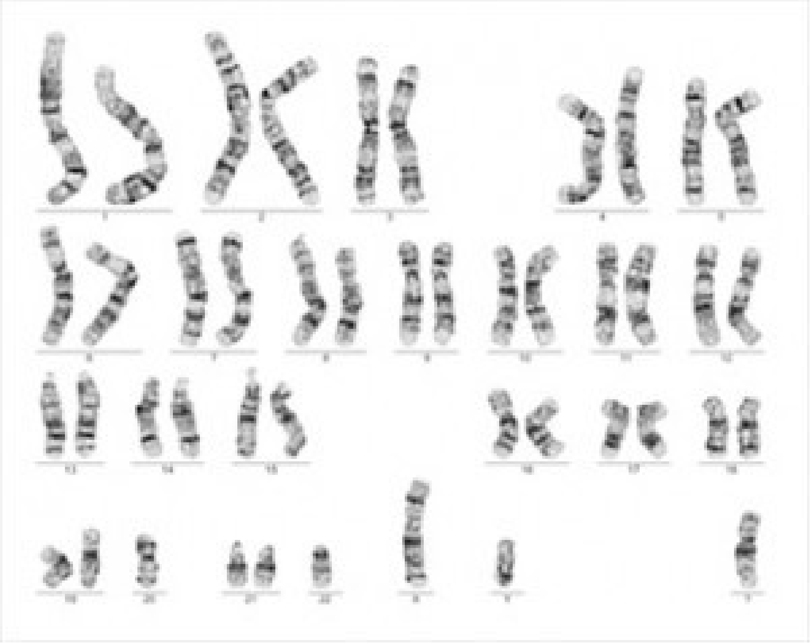
- onemocnění:
  talasémie,
  hereditární hemoragická teleangelektázie

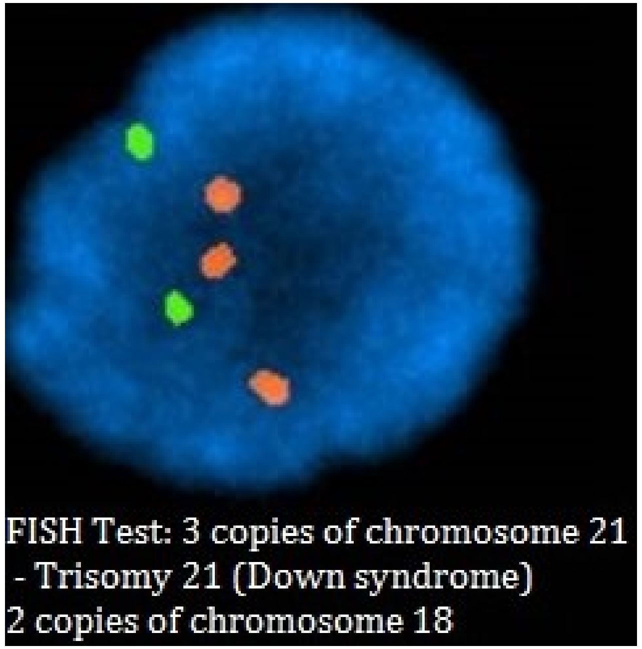


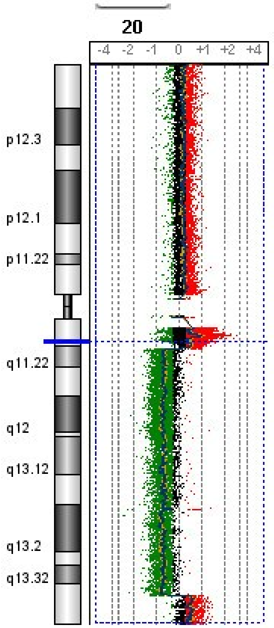
Zare et al., 2017

Cytogenetika

- Klasická cytogenetika – karyotypování
- FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)
- Čipy (array CGH)





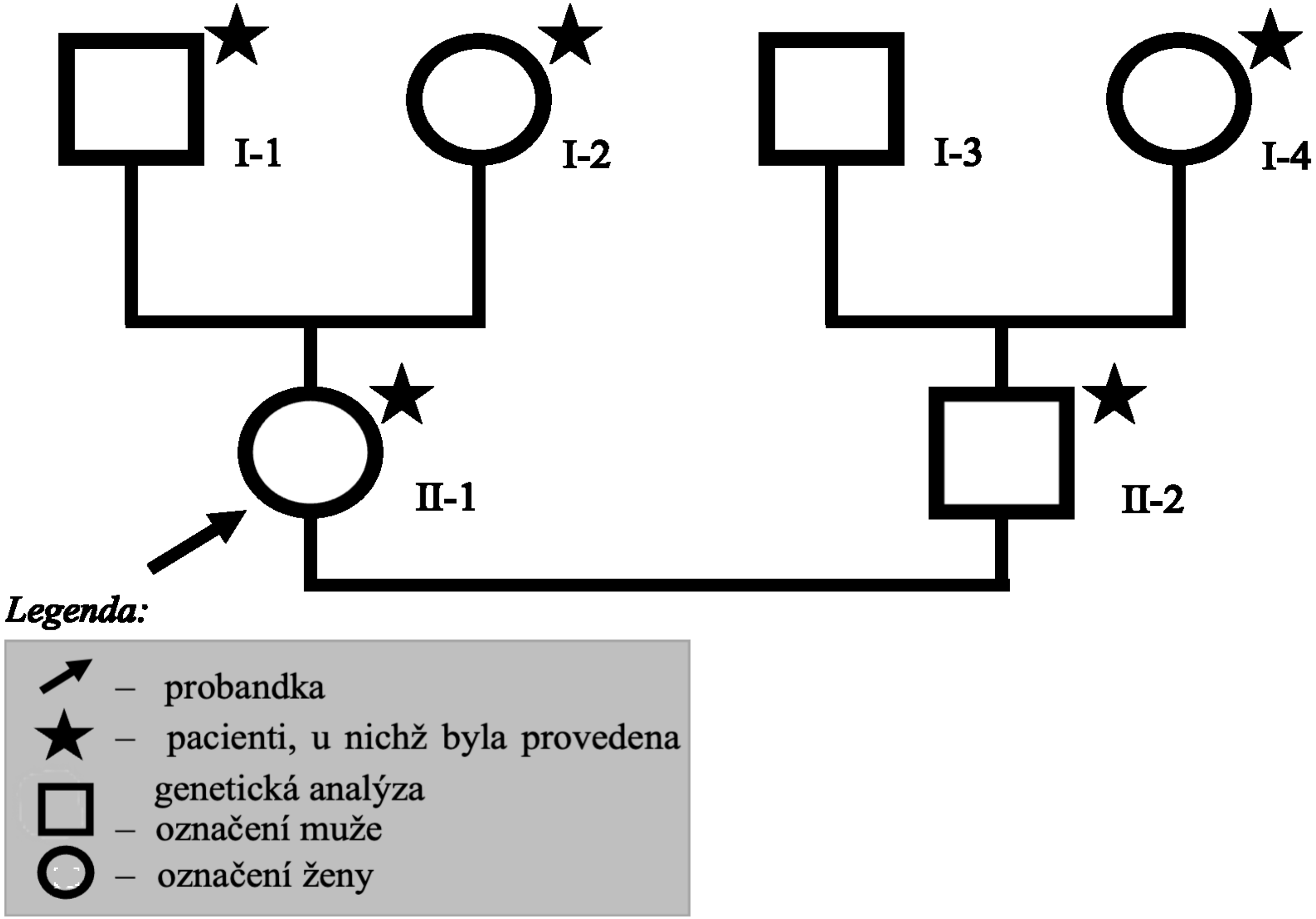


Kazuistika rodiny

-dlouhodobá neplodnost

-záchyt hemoglobinopatie u rodičů v roce 2016
u rodiče probandky

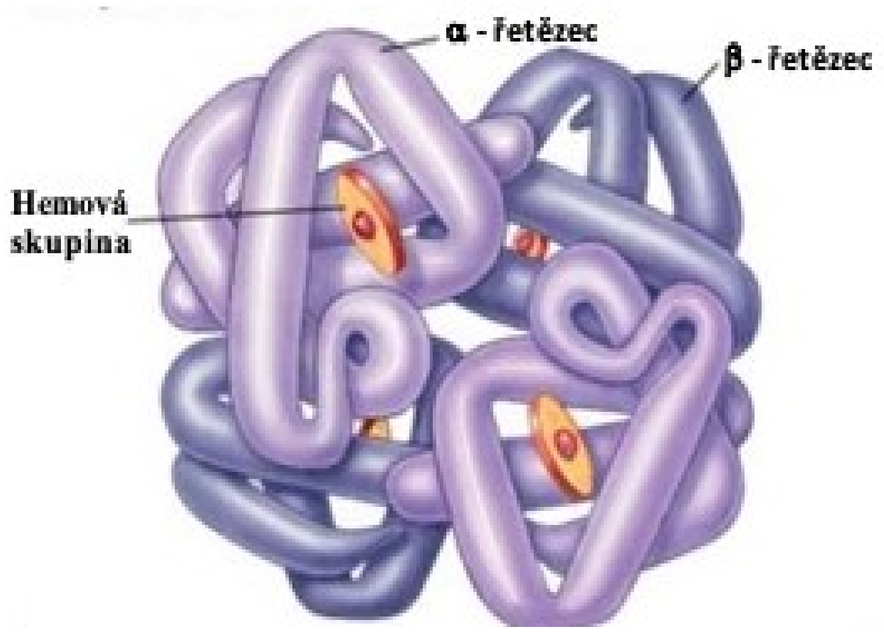
- **genetická analýza alfa a beta- talasémie**



Talasémie

- geneticky podmíněná onemocnění vznikající poruchou syntézy globinových řetězců
- narušení poměru alfa a beta řetězců v molekule Hb
- postihuje 7 % celosvětové populace
- Hemoglobinopatie
- výskyt ve Středozemí a malarických oblastech

  - selekční výhoda přenašečů před malárií
- migrace do Evropy



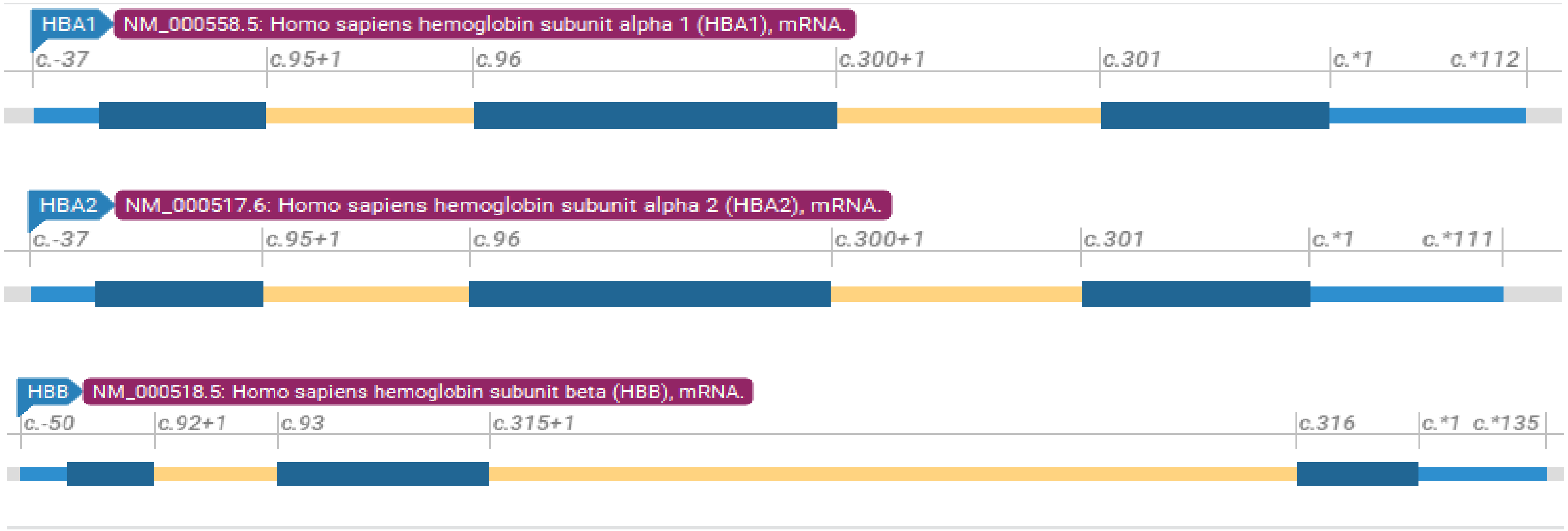
Charakteristika onemocnění talasémie

- Dle typu postiženého řetězce:
  - α-talasémie: minima, minor, choroba hemoglobinu H, **choroba hemoglobinu Barts**
  - β-talasémie: minor, intermedia, **major**
  - vzácné formy (γ, δ)
- bezpříznakový průběh až těžká anémie (transfuzní léčba)
- léčba: transfuze krve, transplantace kostní dřeně, genová terapie
  - často záměna za sideropenii

ref. 17

Charakteristika genů talasémie

- geny *HBA1*, *HBA2* a *HBB* (chromozomy 16 a 11)
- 3 exony, 2 introny, 5'- a 3'-nepřekládané oblasti před a za genem

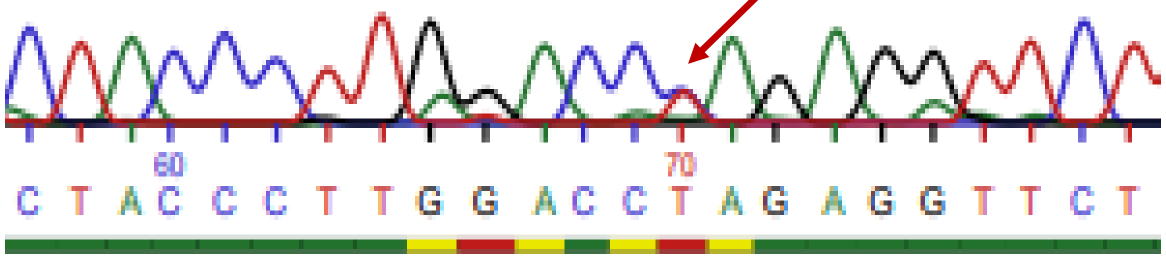


Elektroforeogramy patogenních mutací nalezených u pacientů pomocí Sangerova sekvenování

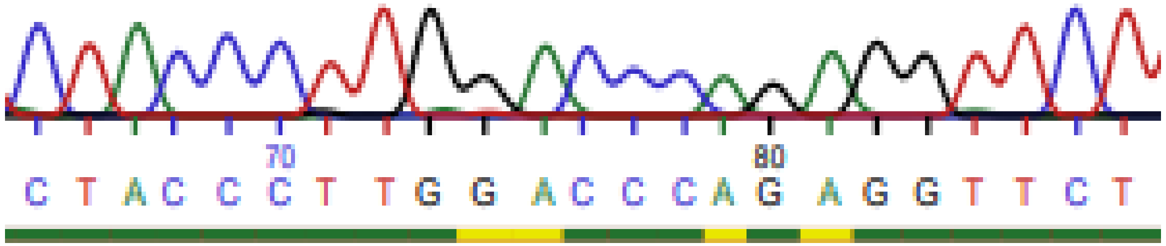
Varianta c.118C>T v *HBB* genu

Mutovaná alela; pacient II-2

c.118 C> T



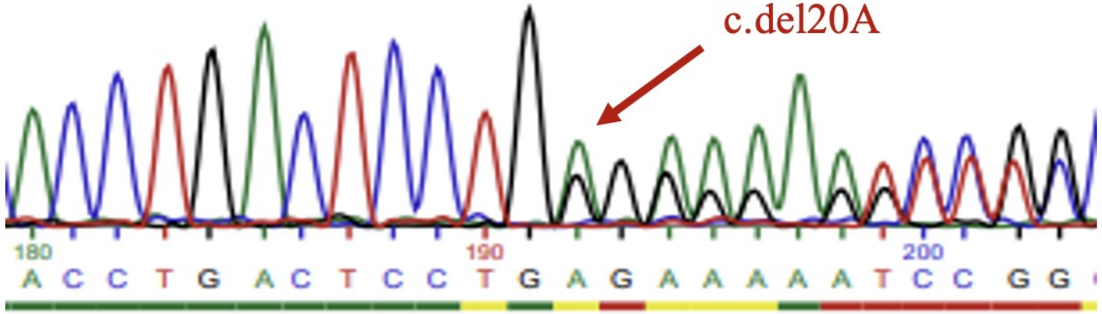
Referenční alela; pacient I-1



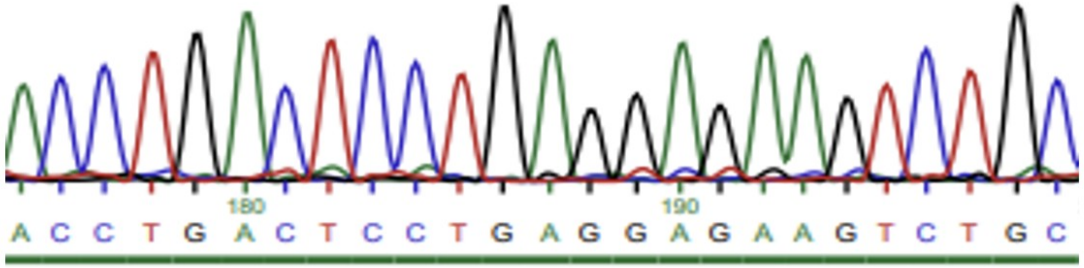
Varianta c.20delA v *HBB* genu

Mutovaná alela; pacient II-1 (mutace nalezena i u pacienta I-1)

c.del20A



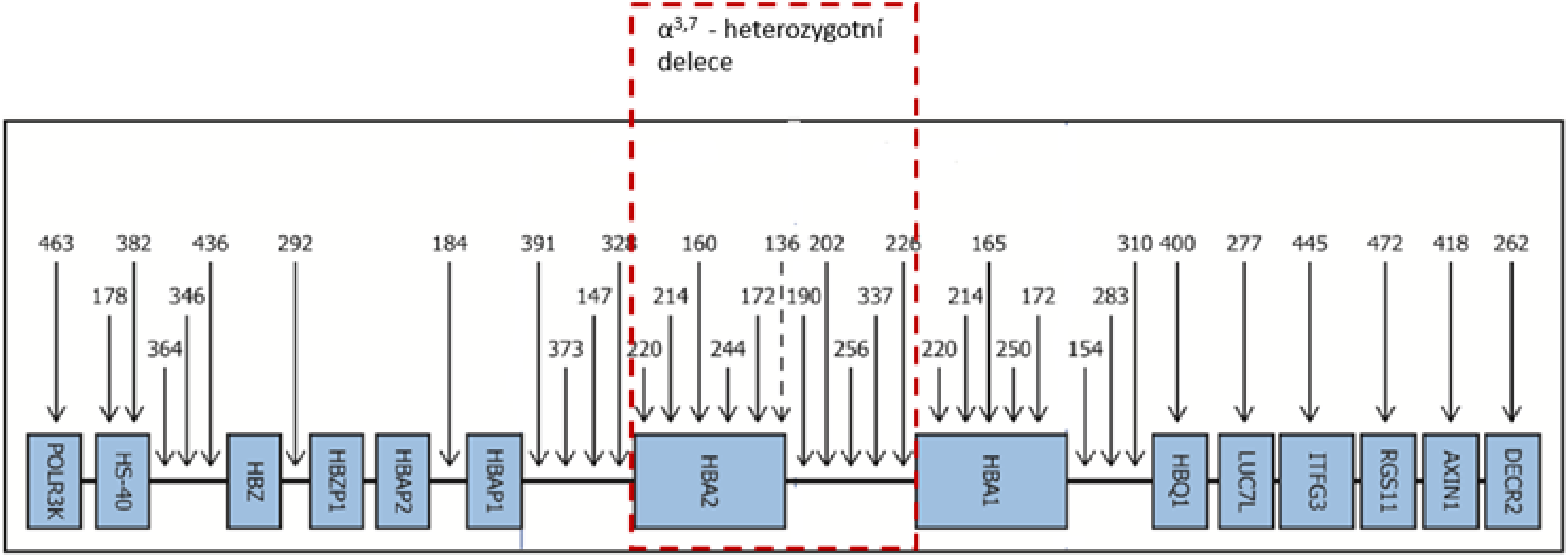
Referenční alela; pacient II-2



Výsledky Sangerova sekvenování

Označení vzorku	HBB gen
Probandka	**c.20delA (HT);** c.9T>C (HZ)
Manžel probandky	**c.118C>T (HT);** c.9T>C (HZ)
Matka probandky	**c.20delA (HT);** c.9T>C (HZ)
Otec probandky	c.9T>C (HZ)
Matka manžela probandky	c.9T>C (HZ)

Výsledky MLPA analýzy



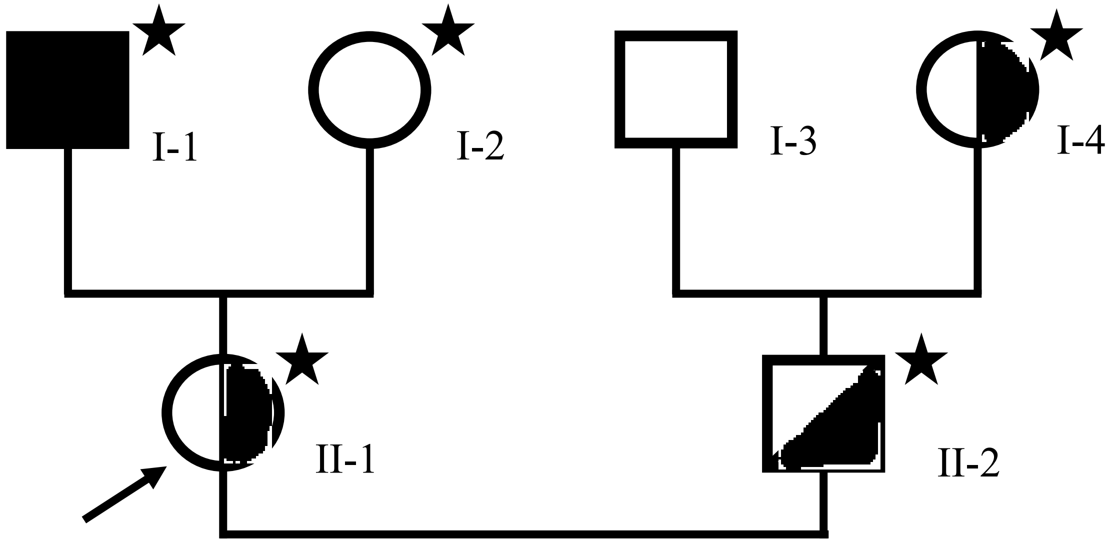
α-3,7 delece

Komplexní genotypy analyzované rodiny

1.alela: α-3,7 delece (*HBA1* + *HBA2*); c.20delA (*HBB*)
2.alela: α-3,7 delece (*HBA1* + *HBA2*)

1.alela: wt
2.alela: wt

1.alela: α-3,7 delece (*HBA1* + *HBA2*)
2.alela: wt



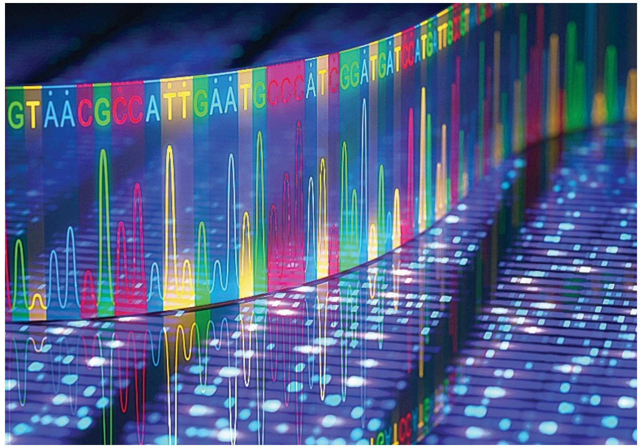
1.alela: α-3,7 delece (*HBA1* + *HBA2*); c.20delA (*HBB*)
2.alela: wt

1.alela: α-3,7 delece (*HBA1* + *HBA2*)
2.alela: c.118C>T (*HBB*)

Závěr kazuistiky

- u čtyř z pěti pacientů – různé mutace pro talasémii
- probandka (II-1) s partnerem (II-2) – zdravými přenašeči alel pro α- a β-talasémii
- pro budoucí potomstvo:
  - 100% šance přenosu minimálně 1 talasemické alely
  - 25% šance vzniku β^{+}-/ β^{0}-talasémie
- doporučeno podstoupení IVF (pro průkaz variant v *HBB* genu)
- preimplantační genetická diagnostika pro stanovení α-3,7 delece není nutná

Sekvenační metody analýzy DNA



1. *Sangerovo sekvenování*
2. *Panelové sekvenování – target NGS*
3. *Celoexomové sekvenování*
4. *Celogenomové sekvenování*

odhalení příčiny nejrůznějších nemocí

2. NGS panel BRONCO

- NGS panel pro hereditární nádorové syndromy

- *HBOC (Hereditary breast and ovarian cancer)*
- *HNPCC/ Lynchův syndrom*
- *familiární adenomatózní polypóza*
- *neurofibromatóza 1. a 2. typu*
- *xeroderma pigmentosum*
- *Li-Fraumeniho syndrom*
- *mnohočetná endokrinní neoplázie*
- *hereditární retinoblastom*
- *maligní melanom aj.*

CEITEC MU

+ IHOK FNB

BRONCO21 - seznam genů								
ACD	*CASP8*	*DPYD*	*FANCI*	*MEN1*	*PALB2*	*RAD54L*	*SDHB*	*VHL*
AIP	*CCND1*	*EFL1*	*FANCL*	*MET*	*PARP1*	*RB1*	*SLC37A4*	*VPS13B*
AK2	*CDC73*	*EGFR*	*FANCM*	*MLH1*	*PCCA*	*RBM8A*	*SLX4*	*VPS45*
ALK	*CDH1*	*EIF2AK3*	*FH*	*MLH3*	*PCCB*	*RECQL*	*SMAD4*	*WAS*
ANKRD26	*CDK12*	*ELANE*	*G6PC3*	*MPL*	*PCNA*	*RECQL4*	*SMARCA4*	*WIPF1*
AP3B1	*CDK4*	*EPCAM*	*GATA1*	*MRE11A*	*PHB*	*RET*	*SMARCA2*	*WRAP53*
APC	*CDKN1B*	*ERCC1*	*GATA2*	*MRP*	*PHOX2B*	*RFWD3*	*SMARCB1*	*WRN*
ATG2B	*CDKN1C*	*ERCC2*	*GFI1*	*MSH2*	*PLA2G2A*	*RHBDF2*	*SMARCE1*	*WT1*
ATM	*CDKN2A*	*ERCC3*	*GPC3*	*MSH3*	*PMS1*	*RMRP*	*SRP72*	*XPA*
ATR	*CEBPA*	*ERCC4*	*GSKIP*	*MSH5*	*PMS2*	*RNF168*	*STK4*	*XPC*
AURKA	*CHEK1*	*ERCC5*	*HAX1*	*MSH6*	*POLD1*	*RPS7*	*STK11*	*XRCC2*
BAP1	*CHEK2*	*ERCC6*	*HNF1A*	*MSR1*	*POLE*	*RPS10*	*SUFU*	*XRCC3*
BARD1	chr9:215121	*ESR1*	*HOXB13*	*MUT*	*POLH*	*RPS15*	*TAZ*	
BCOR	*CLPB*	*ESR2*	*HRAS*	*MUTYH*	*POT1*	*RPS17*	*TCIRG1*	
BLM	*COH1*	*ETV6*	*IKZF1*	*MYD88*	*PPM1D*	*RPS19*	*TINF2*	
BMPR1A	*CSF3R*	*EXO1*	*IVD*	*NBN*	*PRKAR1A*	*RPS24*	*TNFSF5*	
BRAF	*CTC1*	*EXT1*	*JAGN1*	*NF1*	*PTCH1*	*RPS26*	*TERC*	
BRAP	*CTNNB1*	*FAN1*	*KAT5*	*NF2*	*PTEN*	*RPS27A*	*TERT*	
BRCA1	*CXCR2*	*FANCA*	*KIT*	*NHEJ1*	*RAD50*	*RPL5*	*TLR2*	
BRCA2	*CXCR4*	*FANCB*	*KRAS*	*NHP2*	*RAD51*	*RPL11*	*TP53*	
BRCC3	*DCLRE1C*	*FANCC*	*LAMTOR2*	*NOP10*	*RAD51AP1*	*RPL27*	*TSC1*	
BRIP1	*DDB2*	*FANCD2*	*LIG4*	*NRAS*	*RAD51B*	*RPL35a*	*TSC2*	
BTK	*DDX41*	*FANCE*	*LYST*	*NTHL1*	*RAD51C*	*RTEL1*	*TSHR*	
BUB1B	*DICER1*	*FANCF*	*MDM2*	*OGG1*	*RAD51D*	*RUNX1*	*UBE2T*	
CALR	*DKC1*	*FANCG*	*MAD2L2*	*P2RY8*	*RAD54B*	*SBDS*	*USB1*	

298 genů

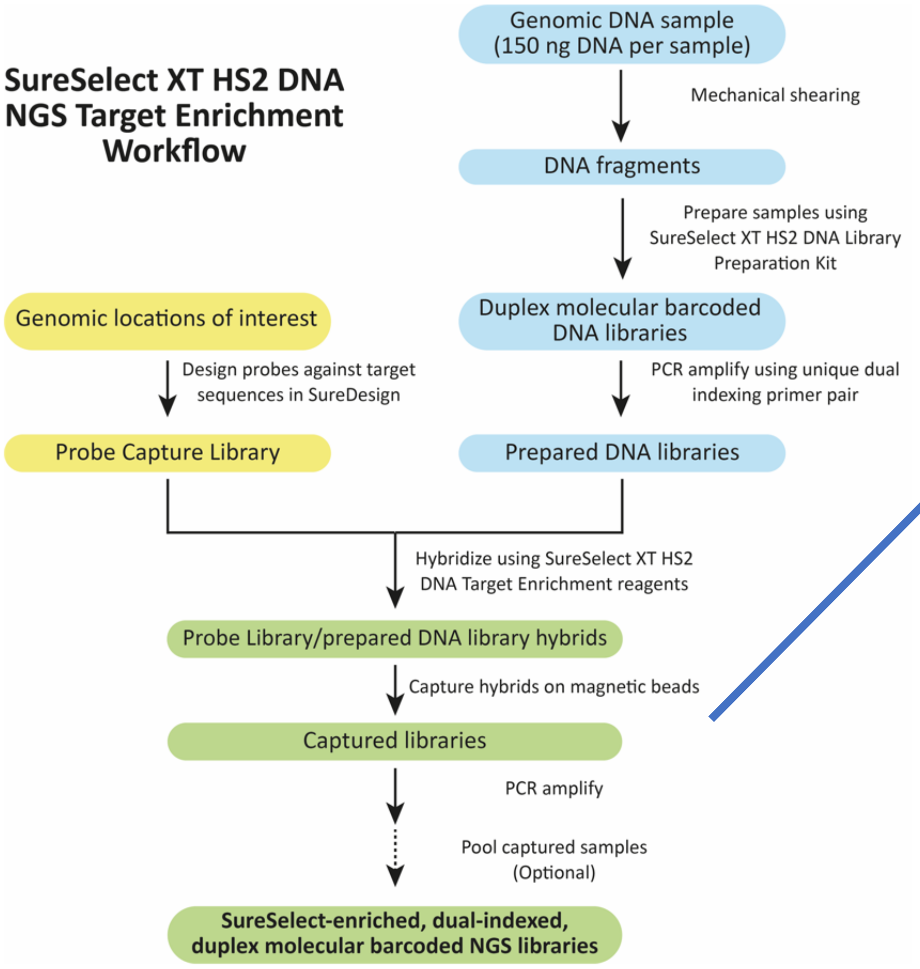
- predispozice k malignitám (onkogeny, nádorové supresory)
- zapojené do opravných drah DNA
- důležité u hematologických malignit

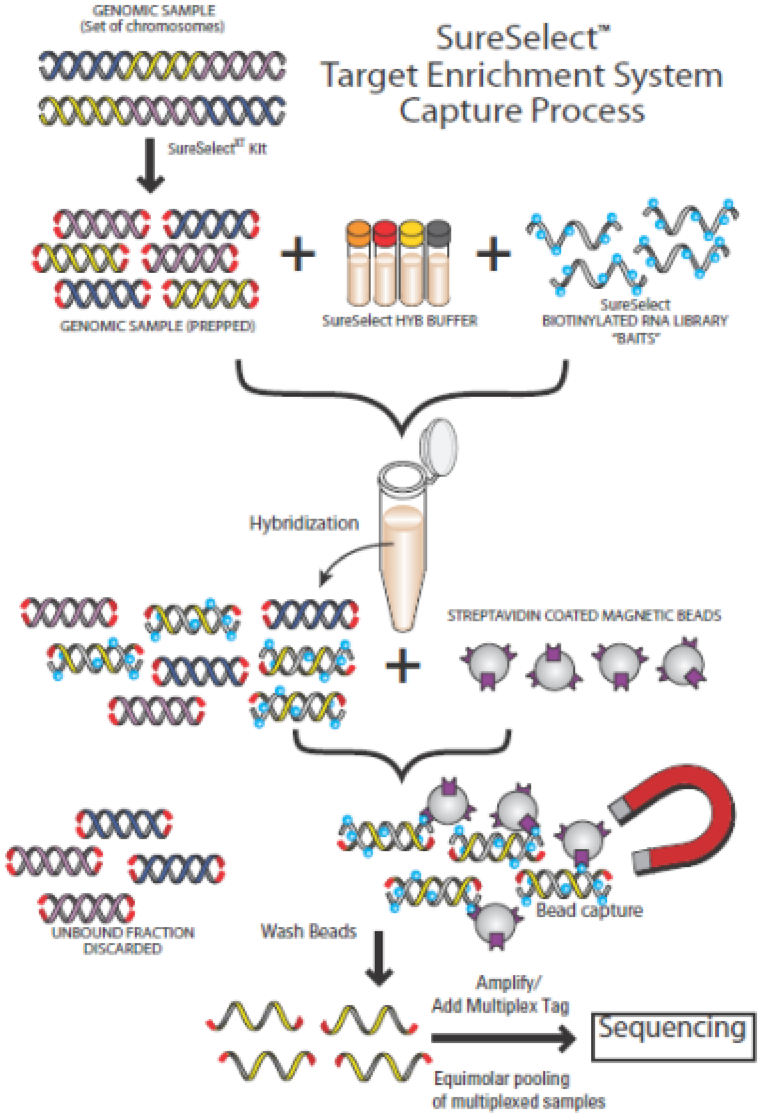
Agilent

SureSelect$^{XT\ HS}$

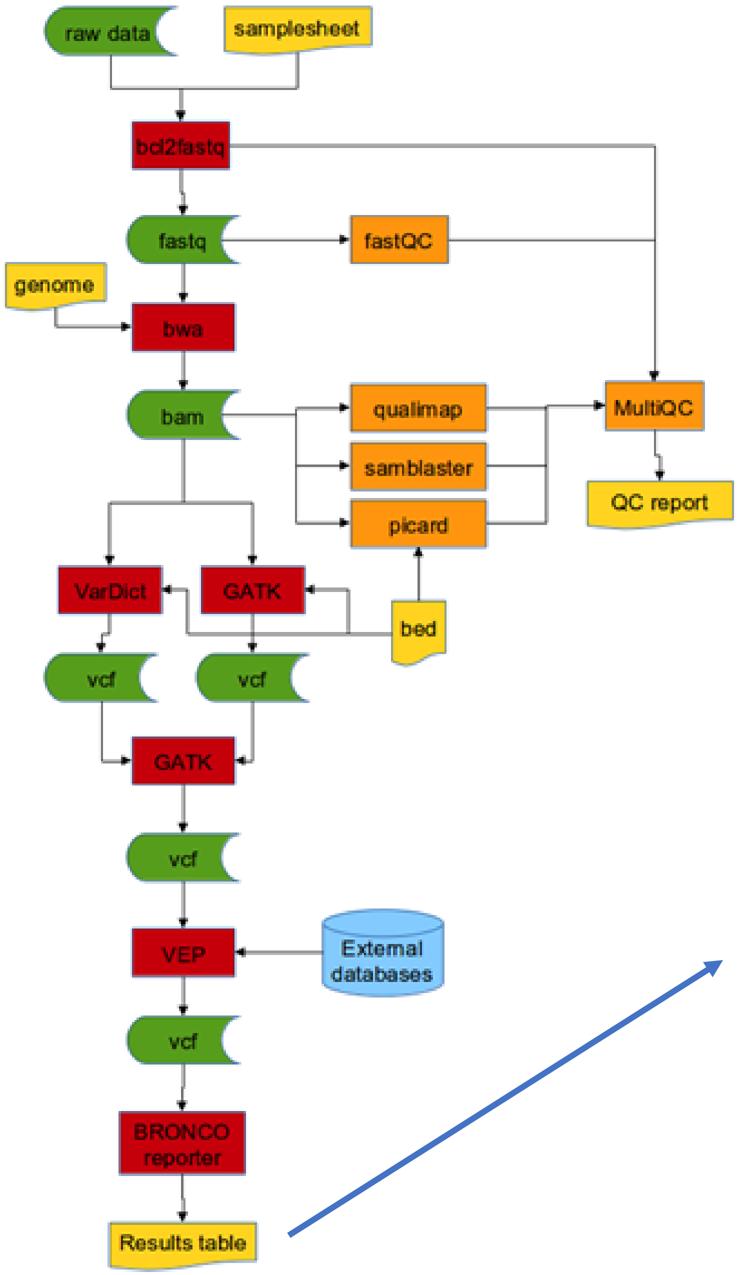
The SureSelect^{XT} Reagent Kits provide DNA library prep solutions with hybrid capture-based target enrichment.

The kits are compatible with FFPE samples and high-quality libraries can be generated from 3 µg DNA input or lower 200 ng input. This kit provides high-complexity libraries for rare allele detection.

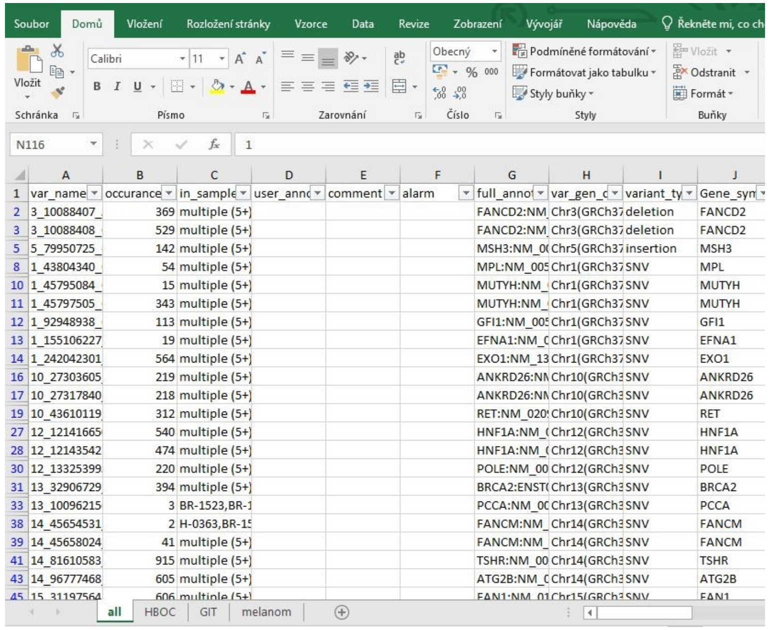

SureSelect XT HS2 DNA NGS Target Enrichment Workflow
Genomic DNA sample (150 ng DNA per sample)
Mechanical shearing
DNA fragments
Prepare samples using SureSelect XT HS2 DNA Library Preparation Kit
Duplex molecular barcoded DNA libraries
PCR amplify using unique dual indexing primer pair
Prepared DNA libraries
Genomic locations of interest
Design probes against target sequences in SureDesign
Probe Capture Library
Hybridize using SureSelect XT HS2 DNA Target Enrichment reagents
Probe Library/prepared DNA library hybrids
Capture hybrids on magnetic beads
Captured libraries
PCR amplify
Pool captured samples (Optional)
SureSelect-enriched, dual-indexed, duplex molecular barcoded NGS libraries


SureSelect™ Target Enrichment System Capture Process
GENOMIC SAMPLE (Set of chromosomes)
SureSelect Kit
GENOMIC SAMPLE (PREPPED)
SureSelect HYB BUFFER
SureSelect BIOTINYLATED RNA LIBRARY "BAITS"
Hybridization
STREPTAVIDIN COATED MAGNETIC BEADS
UNBOUND FRACTION DISCARDED
Bead capture
Wash Beads
Amplify/ Add Multiplex Tag
Sequencing
Equimolar pooling of multiplexed samples

ANALÝZA



- bioinformatický tým
- **<u>in-house pipeline</u>**

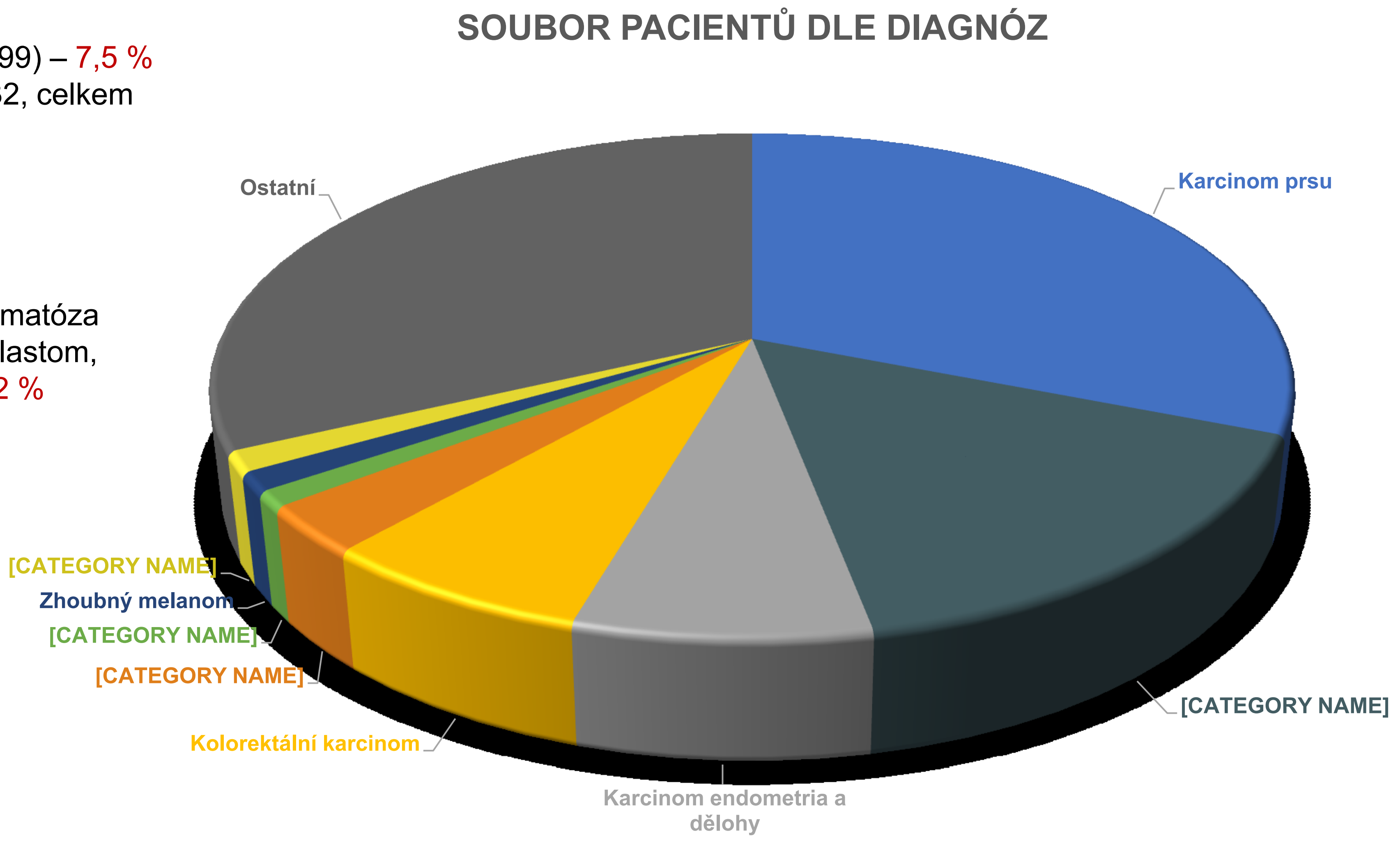


	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	var_name	occurance	in_sample	user_annc	comment	alarm	full_annot	var_gen_c	variant_ty	Gene_sym
2	3_10088407_	369	multiple (5+)				FANCD2:NM_	Chr3(GRCh37	deletion	FANCD2
3	3_10088408_	529	multiple (5+)				FANCD2:NM_	Chr3(GRCh37	deletion	FANCD2
5	5_79950725_	142	multiple (5+)				MSH3:NM_0(	Chr5(GRCh37	insertion	MSH3
8	1_43804340_	54	multiple (5+)				MPL:NM_005	Chr1(GRCh37	SNV	MPL
10	1_45795084_	15	multiple (5+)				MUTYH:NM_	Chr1(GRCh37	SNV	MUTYH
11	1_45797505_	343	multiple (5+)				MUTYH:NM_	Chr1(GRCh37	SNV	MUTYH
12	1_92948938_	113	multiple (5+)				GFI1:NM_005	Chr1(GRCh37	SNV	GFI1
13	1_155106227	19	multiple (5+)				EFNA1:NM_(	Chr1(GRCh37	SNV	EFNA1
14	1_242042301	564	multiple (5+)				EXO1:NM_13	Chr1(GRCh37	SNV	EXO1
16	10_27303605	219	multiple (5+)				ANKRD26:NM	Chr10(GRCh3	SNV	ANKRD26
17	10_27317840	218	multiple (5+)				ANKRD26:NM	Chr10(GRCh3	SNV	ANKRD26
19	10_43610119	312	multiple (5+)				RET:NM_020	Chr10(GRCh3	SNV	RET
27	12_12141665	540	multiple (5+)				HNF1A:NM_(	Chr12(GRCh3	SNV	HNF1A
28	12_12143542	474	multiple (5+)				HNF1A:NM_(	Chr12(GRCh3	SNV	HNF1A
30	12_13325399	220	multiple (5+)				POLE:NM_00	Chr12(GRCh3	SNV	POLE
31	13_32906729	394	multiple (5+)				BRCA2:ENST(	Chr13(GRCh3	SNV	BRCA2
33	13_10096215	3	BR-1523,BR-1				PCCA:NM_00	Chr13(GRCh3	SNV	PCCA
38	14_45654531	2	H-0363,BR-15				FANCM:NM_	Chr14(GRCh3	SNV	FANCM
39	14_45658024	41	multiple (5+)				FANCM:NM_	Chr14(GRCh3	SNV	FANCM
41	14_81610583	915	multiple (5+)				TSHR:NM_00	Chr14(GRCh3	SNV	TSHR
43	14_96777468	605	multiple (5+)				ATG2B:NM_(	Chr14(GRCh3	SNV	ATG2B
45	15_31197564	606	multiple (5+)				FAN1:NM_01	Chr15(GRCh3	SNV	FAN1

Vyšetřeno celkem 1398 pacientů

- Karcinom prsu (408)- 31%
- Karcinom vaječníku (210)- 16%
- Karcinom endometria a dělohy (C54- 99) – 7,5 %
- Kolorektální karcinom (C18-59, C20-32, celkem 91)- 7%
- Karcinom slinivky (43) – 3%
- Karcinom prostaty (14)- 1%
- Zhoubný melanom (21) – 1,2 %
- Karcinom štítné žlázy (19) – 1,3 %
- Ostatní (karcinom žaludku, neurofibromatóza retinoblastom, osteosarkom, meduloblastom, onkologická zátěž v rodě aj.) (424) -32 %

MUDr. Trizuljak – FN Brno, ambulance IHOK (Obilní Trh)
MUDr. Beharka – FN Jihlava, ambulance lékařské genetiky
MUDr. Drábová (Šoukalová, Kalina) - ÚLGG

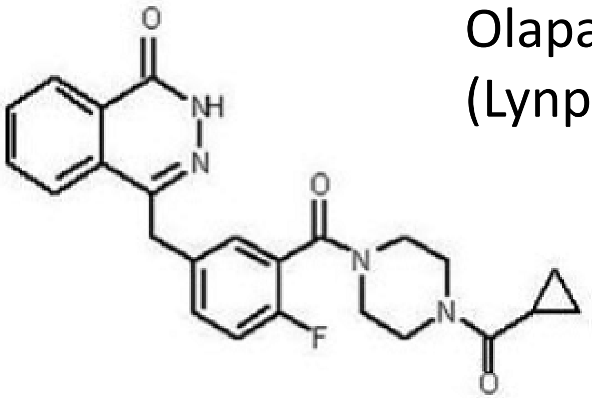


Význam a využití

- výběr optimální léčebné strategie v rámci personalizované medicíny

- došetření ostatních zdravých členů rodiny

- nabídnutí adekvátní profylaxe, screeningu a poradenství



Olaparib
(Lynparza)

Kazuistika

Pacient, ročník 1995

- zralý novorozenec z III. gravidity , 3500g / 50 cm
- po porodu zjištěna **rozštěpová vada** – rozštěp měkkého patra
- PMV: průměrný až mírně opožděný – seděl v 7-8 měsících, chůze po 12. měsíci, první slova v 1.5 roce, dvouslovné věty až ve dvou letech
- ve 2 letech plastická korekce rozštěpové vady
- v 6 letech stomatologická operace
- opakované luxace levého loketního kloubu

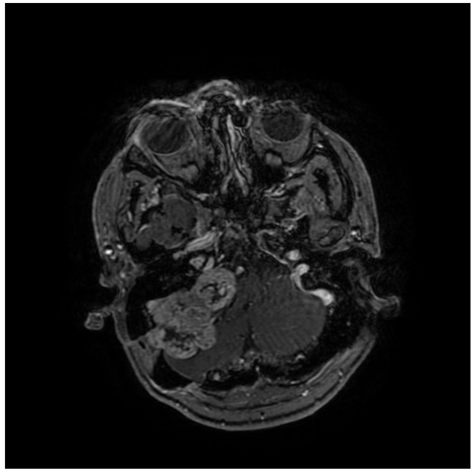
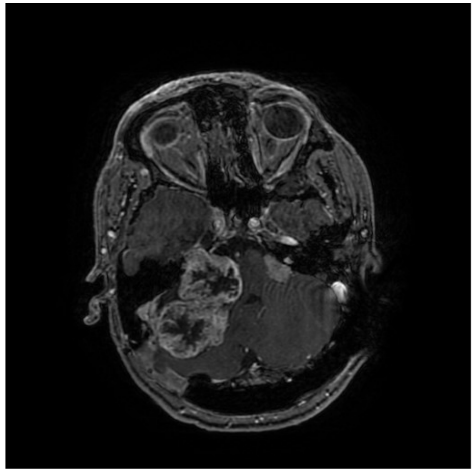
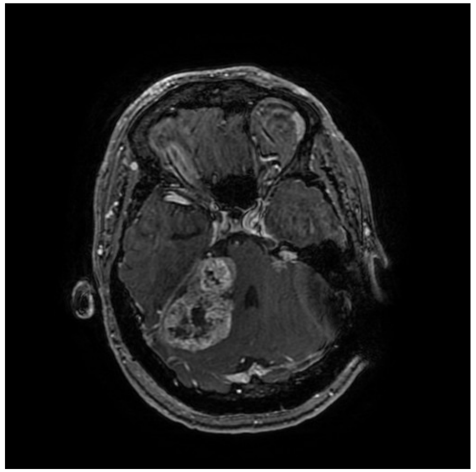
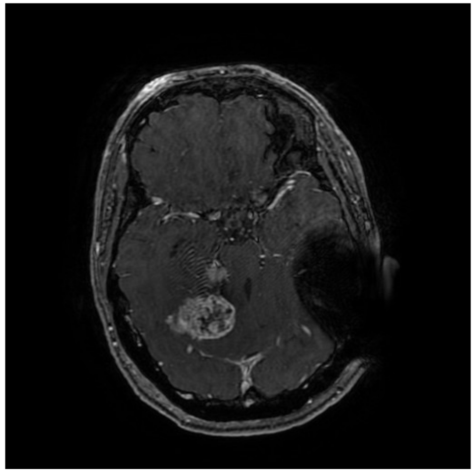
M U N I

Kazuistika

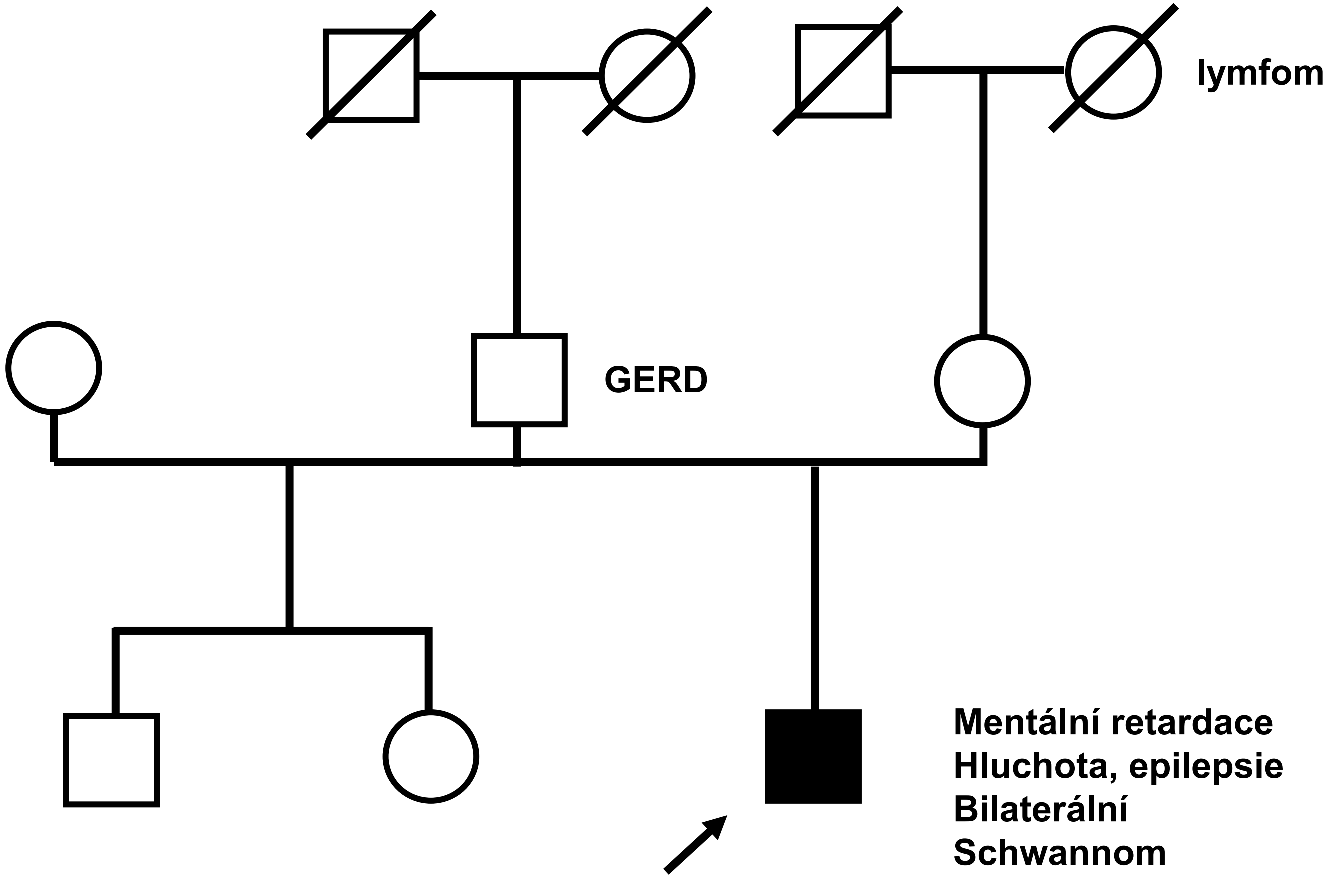
- v dětství opakované infekce v ORL oblasti - rhinitis, sinusitis, otitis media
- po 10. roku života postupná ztráta sluchu – **hypakuse**, těžká nedoslýchavost vpravo, praktická hluchota vlevo (kochleární implantát)
- od 15. roku rozvoj **epilepsie** - záchvaty charakteru zatětí + současně myoklonie DKK, délka jednotlivých záchvatů cca 3 s, denně 1-2x, po záchvatu únava, bolesti hlavy, zavedeny antiepileptika (Lamotrigin) s dobrým efektem
- **mentální retardace**: v popředí výrazná vývojová dysfázie expresivního, částečně i receptivního typu; mentální schopnosti celkově podprůměrné až hraniční, s disharmoniemi, slabší výkony zejména u verbalizovaných úkolů, lepší výkony v testech s jasnou vizuální podporou, dysgrafie

Nádorové onemocnění u probanda

- ve 25 letech (1/2021) diagnostikován Schwannom akustiku
- nález pouze parciálně resekabilní, terapeutické pokusy 1/2021 vpravo, 3/2021 vlevo neúspěšné
- residuální těžká paresa VII. l. dx

Rodokmen


lymfom
GERD
Mentální retardace
Hluchota, epilepsie
Bilaterální
Schwannom

Rodinná anamnéza

- matka nar. 1960 – prodělala Lymeskou boreliózu
  matka matky- ca lymf. uzlin, zemřela
  otec matky- DM, zemřel

- otec nar. 1971 - žaludeční potíže
  matka otce – žaludeční vředy
- otec otce - DM, potíže s játry

- sourozenci: bratr nar. 1985- astma bronchiale, sestra nar. 1990 zdráva

- v rodině jinak bez anamnézy vrozených vývojových vad, poruchy sluchu, dalších nádorových onemocnění

MUNI

Fenotyp pacienta

- výška 160 cm, váha 52 kg
- pyknický habitus, hypotrofie svalstva, zploštělá hrudní kyfóza, zdůrazněna bederní lordóza, genua vaga

- mnohočetné fibromy kůže, pozměněny sekundárním akné, konglomata

- asymetrie obličeje z důvody parézy faciálního nervu, ptóza víček, divergentní strabizmus,, hypertelorismus, epikanty, široký kořen nosu, úzké rty, ušní boltce položené díže a dorsálně rotované, níže položená hranice vlasů

- sekundární pohlavní charakteristiky méně vyvinuté, gynekomastie, zevní genitál mužský

Vyšetření

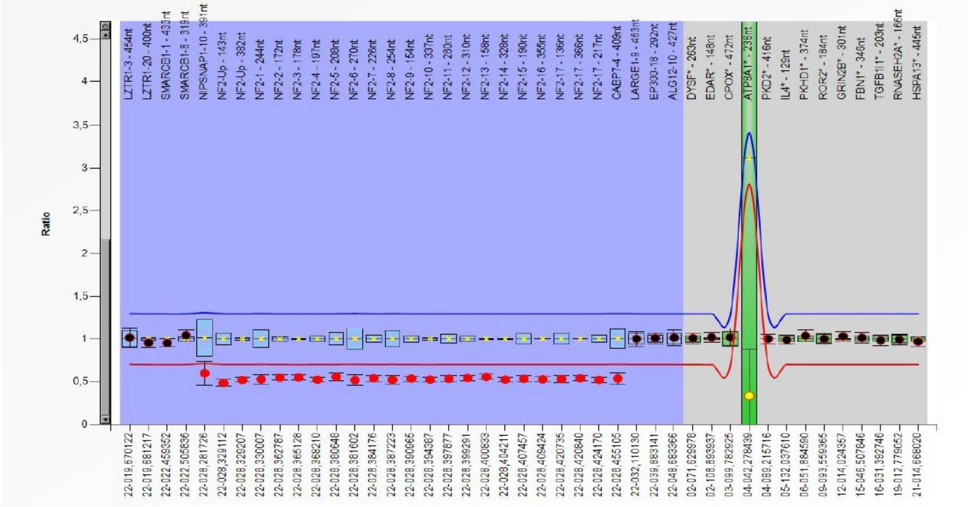
- **Karyotyp (1995)**: 46,XY; normální mužský karyotyp
- **metabolické nemoci /**DPM UDMP VFN Praha/:
  negativní výsledek screeningových vyšetření
- **syndrom Cornelia de Lange**: /laboratoř pro studium mitochondriálních poruch KDDL, VFN Praha – izoelektrická fokusace séra s následnou imunofixací prokázala fyziol. spektrum sialovaných forem transferinu
- **Rok 2023 - vyšetření BRONCO /NGS sekvenování, nádorový panel/:**
  - detekce SNV: negativní sekvenční patogenní varianta pro nádorovou susceptibilitu nenalezena

MUNI

Vyšetření

- **CNV analýza (digitální MLPA): heterozygotní delece *CHEK2* genu**

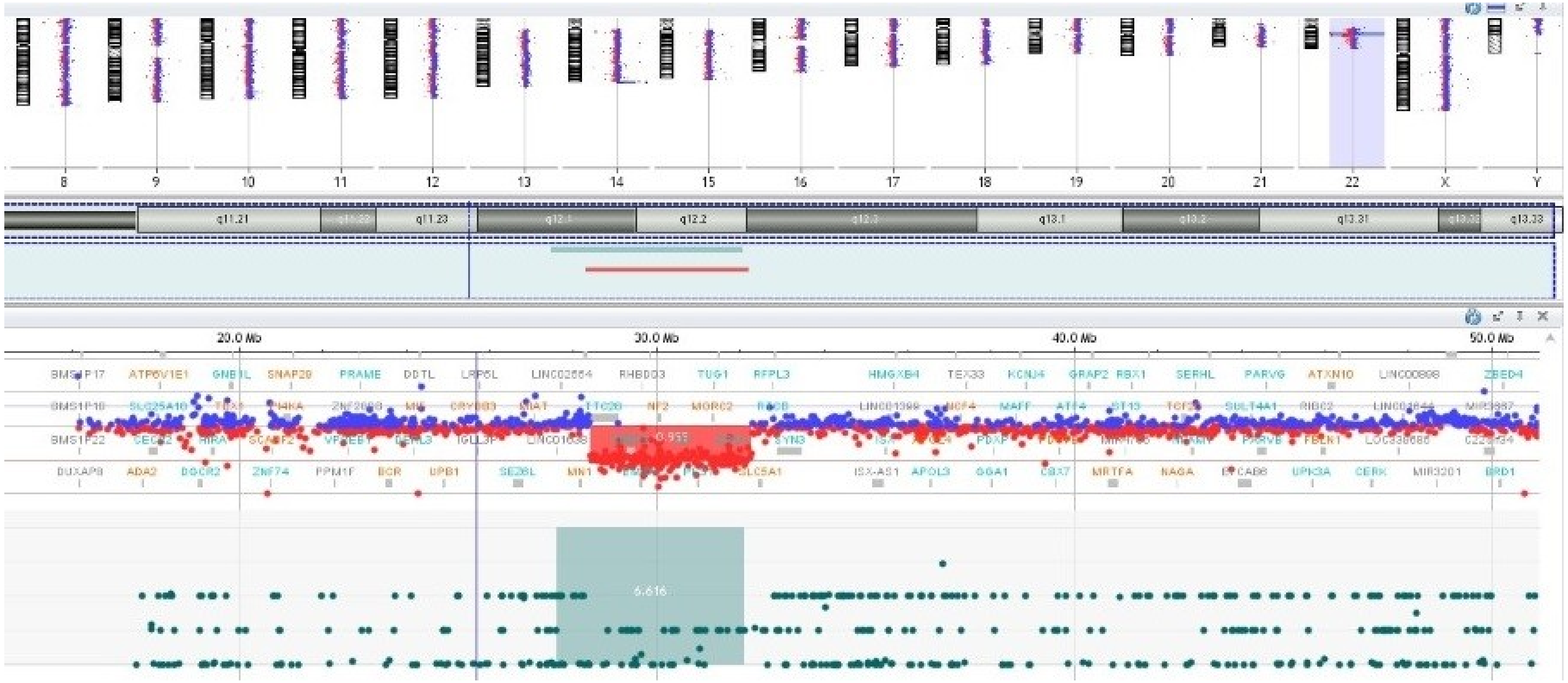
- **MLPA analýza: heterozygotní delece *NF2* genu**



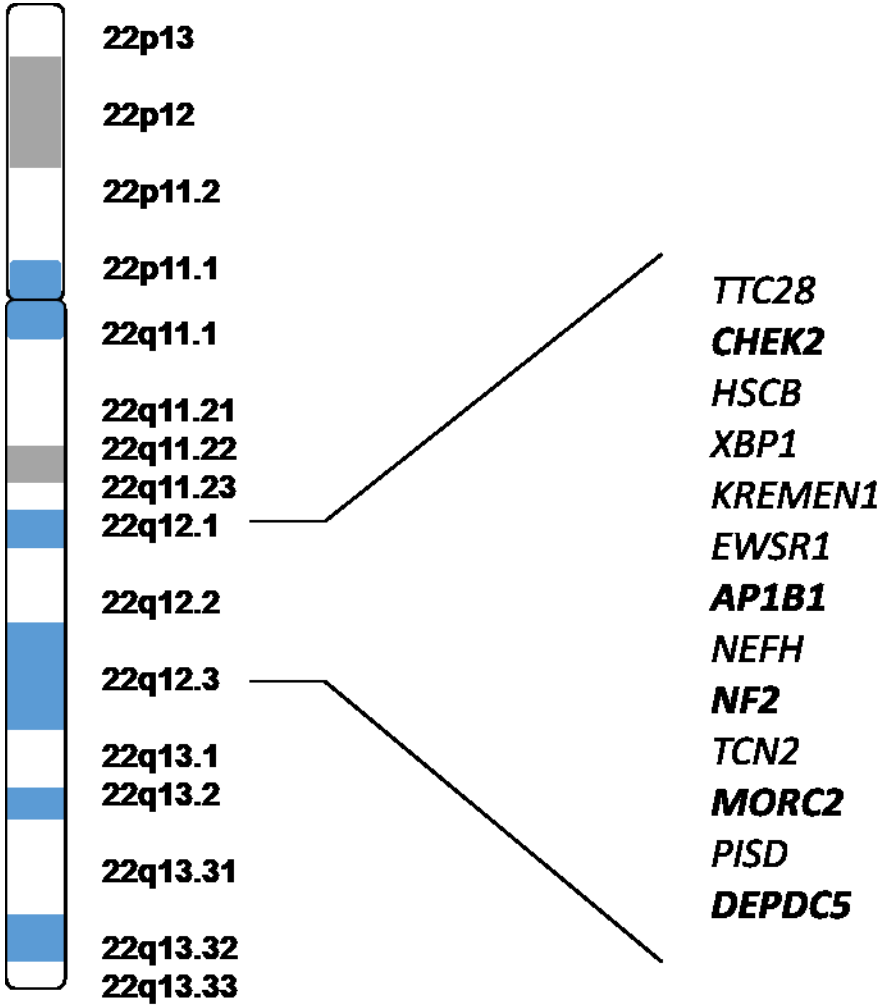
MUNI

Vyšetření

- **Array CGH:** **rozsáhlá delece o velikosti 3.8 Mb: 22q12.1- 22q12.3**



Rozdíly a shody u publikovaných případů



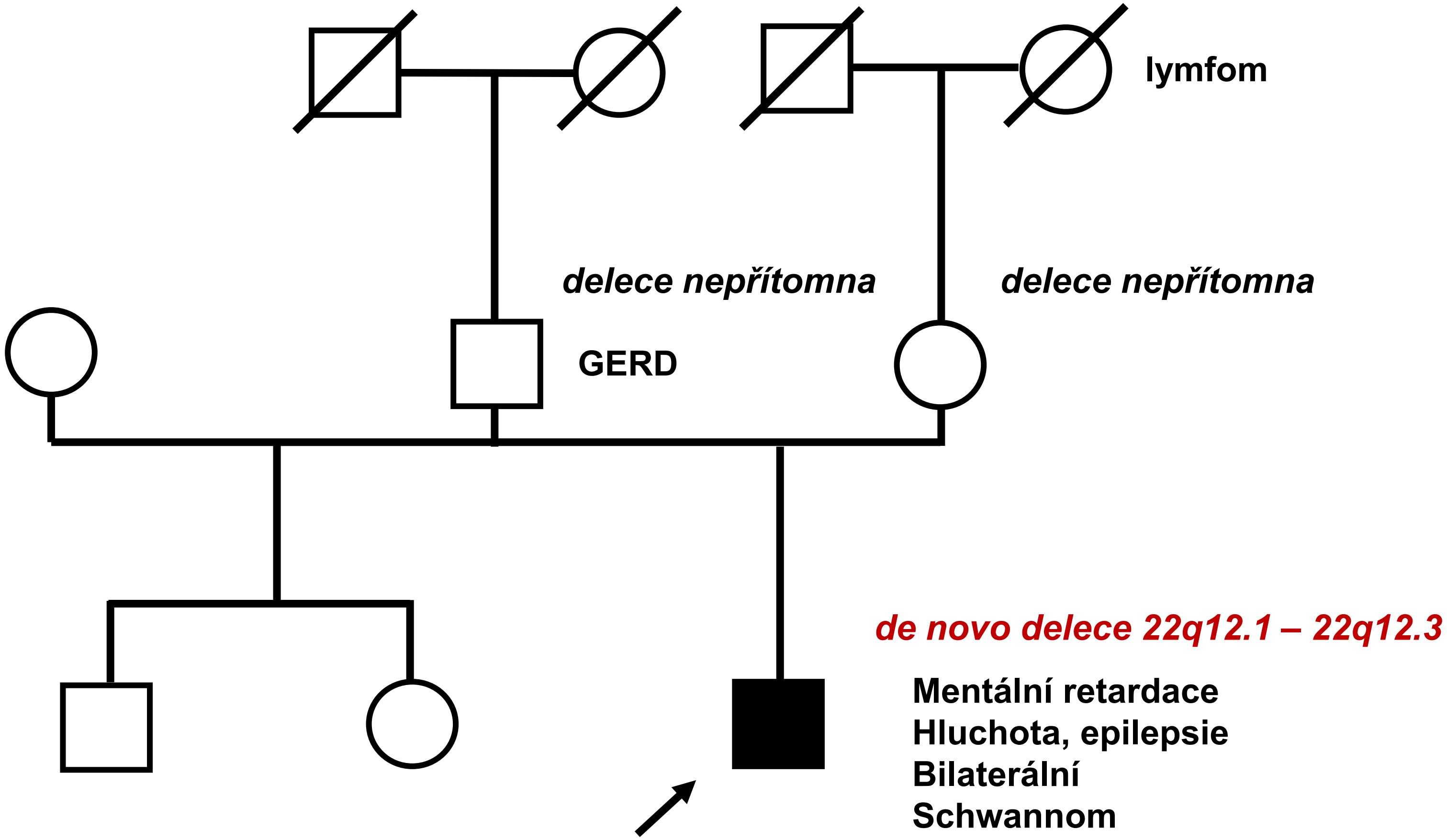
elece *NF2* genu - rozvoj oboustranného Schwannomu – ıedián nástupu příznaků byl 17-22 let. Penetrance nemocnění >95%.

říznak velkých delecí 22q12 - rozštěp patra, rozštěp vuly, vysoké klenuté patro nebo velofaryngeální ısuficience.

elece 22q12 - rozvoj epilepsie. Všichni byli nositeli ıutace v genu *DEPDC5* gene (at the distal part of the eletion in present case). Ztrátové mutace *DEPDC5* ɔůsobují familiární fokální epilepsii charakterizovanou ɔkálními záchvaty vznikajícími v různých kortikálních blastech.

MUNI

de novo delece 22q12.1 – 22q12.3

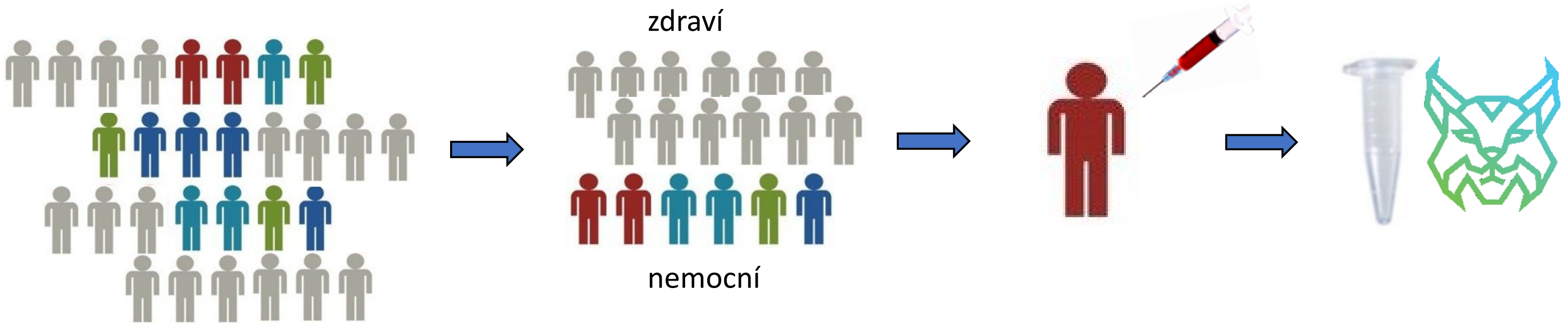


2. NGS panel LYNX

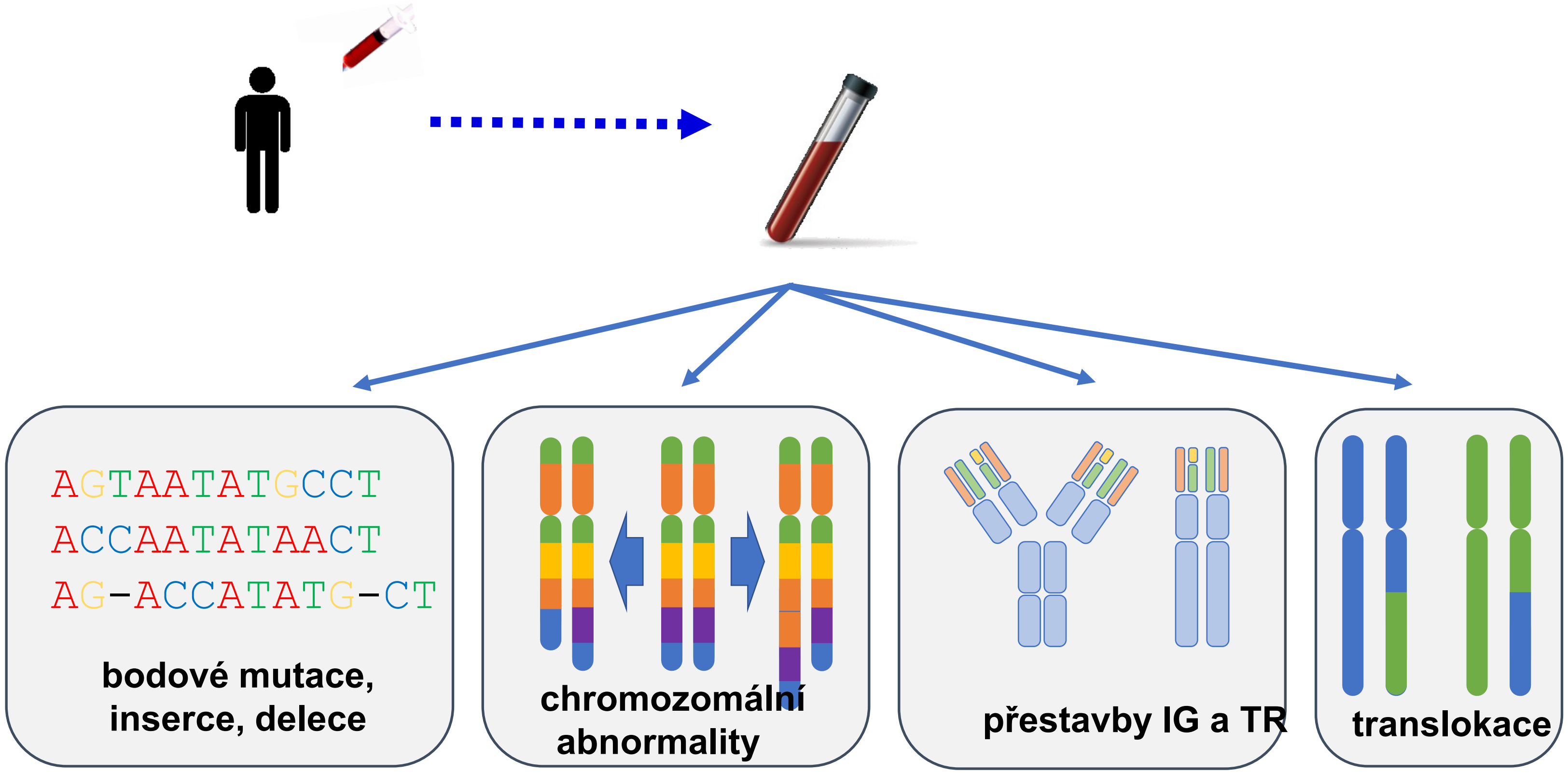
(LYmphoid NeXt-Generation Sequencing) diagnostic tool

- všestranný nástroj určený pro diagnostické i výzkumné hematoonkologické laboratoře (CLL, ALL, AML, lymfomy)
- umožňuje v jednom testu analyzovat různé typy molekulárních biomarkerů u nejběžnějších typů lymfoproliferativních onemocnění

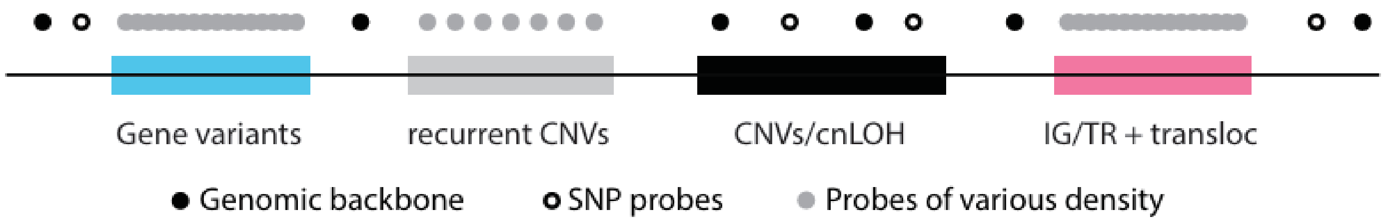
(ČR: > 2000 lidí / rok)



Moderní laboratorní postup (NGS)



Chráněno užitným vzorem (PUV 2020-37316)



List of genes

ARID1A[1,4,6,7]	*ASXL*[1,2]	*ATM*[1,5]	*BCL2*[1,3-5]	*BCL6*[1,3-5]
BIRC3[1,5]	*BRAF*[1-4]	*BTG1*[1,3]	*CARD11*[1,3-5]	*CCND1*[5]
CD79A[1,3]	*CD79B*[1,3,5]	*CDKN2A*[1-5]	*CDKN2B*[2-4]	*CHD2*[1]
CREBBP[1-4]	*CRLF2*[2]	*CXCR4*[3,7]	*EBF1*[3]	*EGR2*[1]
EP300[1,3,4]	*ETV6*[2]	*EZH2*[2-4]	*FBXW7*[1]	*FLT3*[2]
FOXO1[4]	*ID3*[3,6]	*IKZF1*[2]	*IKZF3*[1]	*IL7R*[2]
JAK1[1,2]	*JAK2*[1,2]	*JAK3*[2]	*KMT2A*[1,2]	*KMT2D*[1,3-5]
KRAS[1,2]	*MEF2B*[3-5]	*MGA*[1]	*MYC*[2,4,6]	*MYD88*[1,3-5,7]
NF1[1,2]	*NFKBIE*[1]	*NOTCH1*[1,3-6]	*NOTCH2*[3,5]	*NRAS*[1,2]
NSD2[5]	*P2RY8*[3]	*PAG1*[2]	*PAX5*[1,2]	*PIM1*[1,3]
PTEN[2-4]	*PTPN11*[1,2]	*POT1*[1]	*RB1*[1,2]	*RPS15*[1]
RUNX1[2]	*SAMHD1*[1]	*SETD2*[1,2]	*SF3B1*[1,5]	*SH2B3*[2]
STAT6[3,4]	*TCF3*[3,6]	*TNFRSF14*[3,4]	*TP53*[1-6]	*UBR5*[5]
XPO1[1]	*ZMYM3*[1]			

| exon-proximal probes | 3´UTR region included | introns included

Rearrangements[1-7]

IGH locus	79 genes
IGK locus	45 genes
IGL locus	42 genes
TRA locus	96 genes
TRB locus	64 genes
TRG locus	13 genes
TRD locus	11 genes

Translocations[3-6]

CCND1/IGH	t(11;14)
BCL2/IGH	t(14;18)
BCL6/IGH	t(3;14)
MYC/IGH	t(8;14)

Reccurent deletions[1,5]

> 300 kb/1 Mb

Del17p

Del11q

Del13q

Genome wide CNVs[1-7]

> 6 MB across whole genome

cnLOH[1-7]

according to SNP probe density

[1]CLL [2]ALL [3]DLBCL [4]FL [5]MCL [6]BL [7]WM

MUNI

Nově vytvořený software

MUNI Innovation Award 2023

Praktické využití

Diagnostika a výzkum: > 400 vzorků

- IHOK FNB: > 100 diagnostických vzorků
- vyšetřované diagnózy: lymfoidní leukémie, lymfomy, mnohočetný myelom, …
- materiál: krev, kostní dřeň, zamražená tkáň, parafinové bločky, …
- projekty:
  - klonální evoluce chronické lymfocytární leukémie
  - analýza volné DNA u pacientů s lymfomy
  - a další

3. Celoexomové sekvenování (WES) u familiárních onemocnění krvetvorby

- vzácná a heterogenní onemocnění: variabilní klinická expresivita
  nekompletní penetrance fenotypu
  různý typ dědičnosti

- obtížné stanovení diagnózy – překryv klinických projevů, mírné formy
- dospělý věk, těžší symptomy - orgánové dysfunkce, postižení tkání, rozvoj syndromů
- přes 300 genů – některé geny predisponují ke vzniku hematologické malignity (AML, ALL, MDS) či solidních nádorů
- molekulární základ – buněčný růst, checkpoint aktivace buněčného cyklu, biogeneze ribozómů, nerovnováha telomer, homologní rekombinace, procesy DNA reparace

1. Vrozené anemie

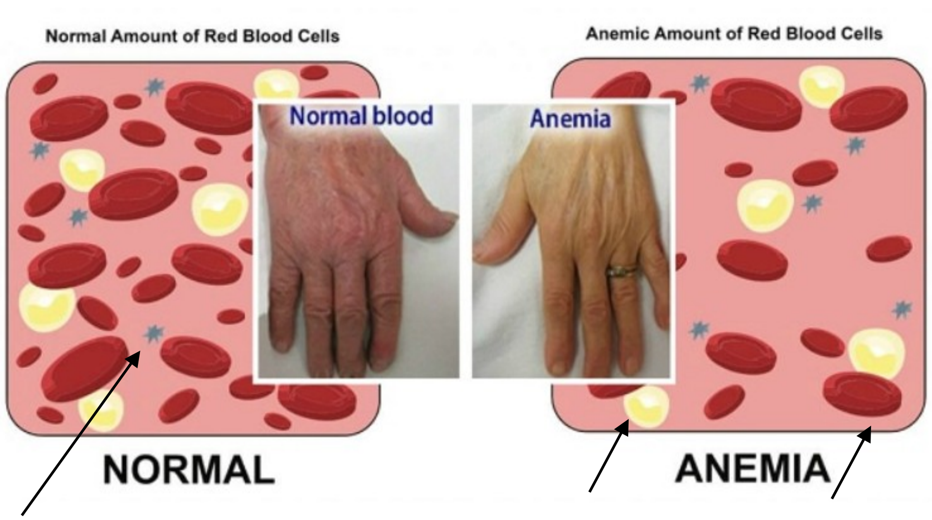
- diagnostika krevního obrazu: MCV (erytrocyty), počet retikulocytů, anemický syndrom

- anemický syndrom:

- pokles koncentrace Hb ‹ 130 g/l u mužů,
  ‹ 120 g/l u žen
- slabost, celková únava, bledost, dýchavičnost, tachykardie …

- 70 genů (produkce a struktura erytrocytů – změny v Hb, diferenciaci a proliferaci erytrocytů, bun. stěny, jejich enzymů)

- nekorelace mezi genotypem a fenotypem
  - AD, AR dědičnost



Krevní destičky leukocyty erytrocyty

https://www.practo.com/health-wiki/anemia-meaning-symptoms-and-types/93/article

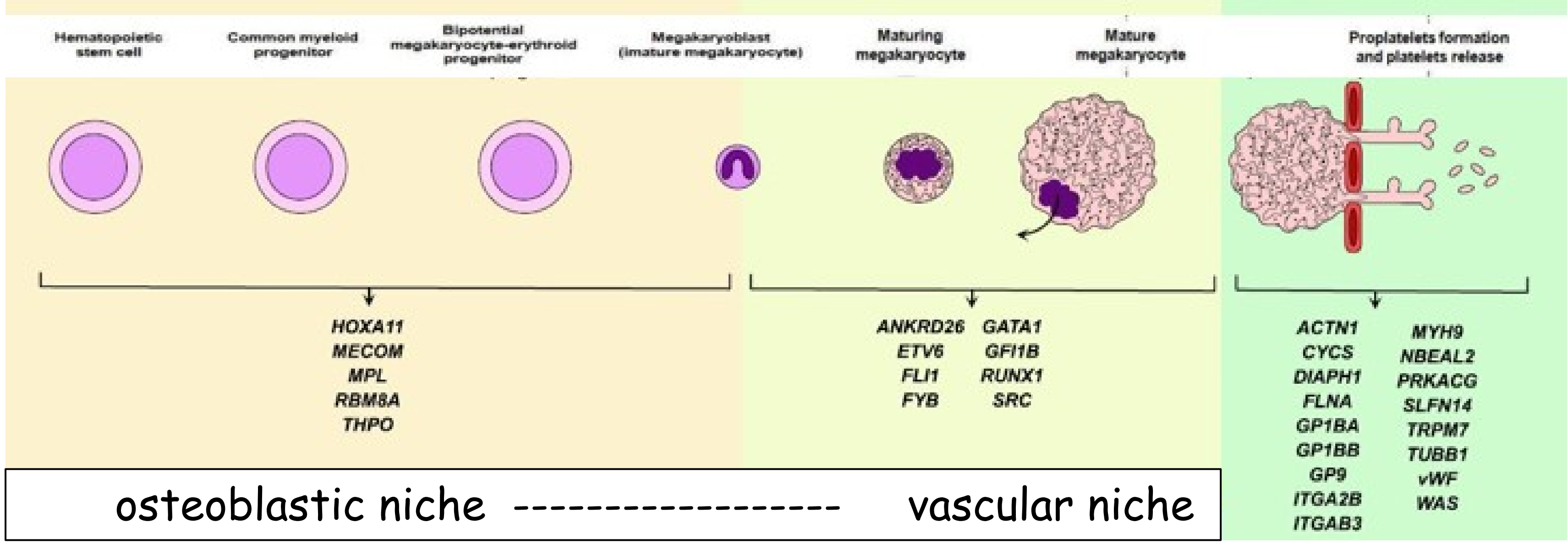
✓ *talasémie, Diamond-Blackfan, Fanconi A, Dyskeratosis congenita, aplastická anémie, hereditární sférocytóza, xerocytóza, stomatocytóza*

2. Dědičné trombocytopenie (IT)

- Nízká hodnota krevních destiček: mírná 100 – 150 $\times 10^9$/L
  středně těžká 50 – 100 $\times 10^9$/L
  těžká < 50 $\times 10^9$/L
  → žádná - mírně zvýšená krvácivost – těžké stavy

- 40 genů: megakaryopoetických a trombopoetických procesech

Diferenciace a dozrávání megakaryocytů | Produkce krevních destiček



- Uvolnění krevních destiček do krevního oběhu, řečiště

Staňo Kozubik et al., 2021

3. Vrozené neutropenie (CN)

- Krevní obraz: poškozená maturace neutrofilních granulocytů
  (počet neutrofilů ‹ 2,0 x 10^9/l)

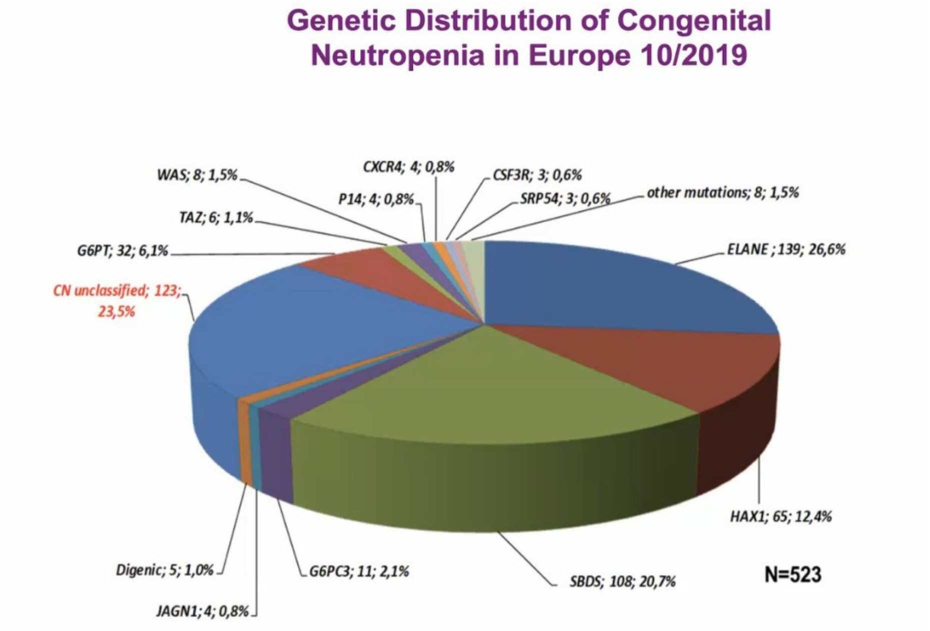
❖ AD, AR, X-vázaná dědičnost

✓ *sy, Fanconi A, GATA2 syndrom*

- sklon k infekcím, různé orgánové dysfunkce,
- predispozice k leukémiím (MDS, AML), ke vzniku lymfomů

- asociováno 24 genů:

ELANE – těžká CN / cyklická CN
HAX1 - Kostmannova nemoc (CNS, MR)
SBDS - Schwachman-Bodian-Diamond sy
GATA2 sy – mírná forma CN

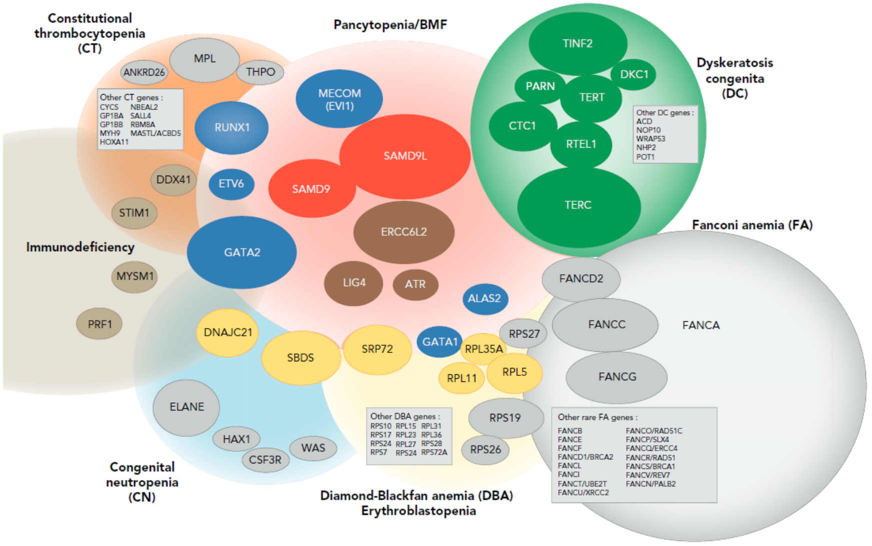


Welte et al., 2020

4. Syndromy selhání kostní dřeně (BMFS)

- podmíněné selháním funkce jedné nebo více hematopoetických linií
- *jedna nebo více abnormalit jiných orgánů*
- *zvýšené riziko rakoviny (predispozice k leukémii nebo solidním nádorům - krku a hlavy)*
- *BMFS ≈ dědičné cytopenie - odlišná klasifikace dětství*
- *více než 60 genů*

✓ *Fanconi anemie*
✓ *Dysceratosis congenita*
✓ *Shwachman-Bodian-Diamond sy*
✓ *Diamond-Blackfan anemie,*
✓ *těžká CN*



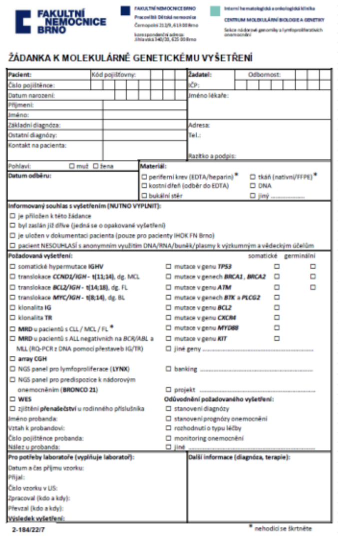
Soulier et al., 2018

Kudy vede cesta ke celoexomovému sekvenování ?

❖ indikace k vyšetření zárodečných variant: klinický genetik

FN Brno - IHOK: prof. MUDr. Michael Doubek, CSc.
MUDr. Jakub Trizuljak
- lékaři z Ústavu lékařské genetiky a genomiky

- žádanka k vyšetření, informovaný souhlas (FNB / CEITEC MU)



FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO
Pracoviště Dětská nemocnice
Černopolní 212/9, 613 00 Brno
korespondenční adresa: Jihlavská 340/20, 625 00 Brno

Interní hematologická a onkologická klinika
CENTRUM MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENETIKY
Sekce nádorové genomiky a lymfoproliferativních onemocnění

ŽÁDANKA K MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉMU VYŠETŘENÍ

Pacient: Kód pojišťovny:
Číslo pojištěnce:
Datum narození:
Příjmení:
Jméno:
Základní diagnóza:
Ostatní diagnózy:
Kontakt na pacienta:

Žadatel: Odbornost:
IČP:
Jméno lékaře:
Adresa:
Tel.:
Razítko a podpis:

Pohlaví: ☐ muž ☐ žena
Datum odběru:

Materiál:
☐ periferní krev (EDTA/heparin)*
☐ kostní dřeň (odběr do EDTA)
☐ bukální stěr
☐ tkáň (nativní/FFPE)*
☐ DNA
☐ jiný ……………

Informovaný souhlas s vyšetřením (NUTNO VYPLNIT):
☐ je přiložen k této žádance
☐ byl zaslán již dříve (jedná se o opakované vyšetření)
☐ je uložen v dokumentaci pacienta (pouze pro pacienty IHOK FN Brno)
☐ pacient NESOUHLASÍ s anonymním využitím DNA/RNA/buněk/plasmy k výzkumným a vědeckým účelům

Požadovaná vyšetření:
☐ somatické hypermutace **IGHV**
☐ translokace ***CCND1/IGH*** **- t(11;14)**, dg. MCL
☐ translokace ***BCL2/IGH*** **- t(14;18)**, dg. FL
☐ translokace ***MYC/IGH*** **- t(8;14)**, dg. BL
☐ klonalita **IG**
☐ klonalita **TR**
☐ **MRD** u pacientů s CLL / MCL / FL *
☐ **MRD** u pacientů s ALL negativních na *BCR/ABL* a MLL (RQ-PCR z DNA pomocí přestaveb IG/TR)
☐ **array CGH**
☐ NGS panel pro lymfoproliferace (**LYNX**)
☐ NGS panel pro predispozice k nádorovým onemocněním (**BRONCO 21**)
☐ **WES**
☐ zjištění **přenašečství** u rodinného příslušníka
Jméno probanda:
Vztah k probandovi:
Číslo pojištěnce probanda:
Nález u probanda:

	somatické	germinální
☐ mutace v genu ***TP53***	☐	☐
☐ mutace v genech ***BRCA1***, ***BRCA2***	☐	☐
☐ mutace v genu ***ATM***	☐	☐
☐ mutace v genech ***BTK*** a ***PLCG2***	☐	
☐ mutace v genu ***BCL2***	☐	
☐ mutace v genu ***CXCR4***	☐	
☐ mutace v genu ***MYD88***	☐	
☐ mutace v genu ***KIT***	☐	

☐ jiné geny ……………
☐ banking ……………
☐ projekt ……………

Odůvodnění požadovaného vyšetření:
☐ stanovení diagnózy
☐ stanovení prognózy onemocnění
☐ rozhodnutí o typu léčby
☐ monitoring onemocnění
☐ jiné ……………

Pro potřeby laboratoře (vyplňuje laboratoř):
Datum a čas příjmu vzorku:
Přijal:
Číslo vzorku v LIS:
Zpracoval (kdo a kdy):
Převzal (kdo a kdy):
Výsledek vyšetření:

Další informace (diagnóza, terapie):

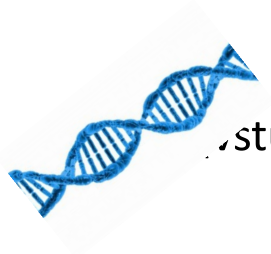
2-184/22/7
* nehodící se škrtněte

- odběr biologického materiálu – periferní krev (2 – 5 ml), bukální stěr
  - kostní dřeň, jiný odběr (při rozvoji malignity)

- výběr pacientů + sdílení informací o projevech nemoci + výsledky z vyšetření
  „přesný fenotyp → cílený genotyp“

- minimálně 2 postižení a 2 zdraví jedinci v rodině
- trio-analýzy

Workflow pro metodiku WES

- izolace DNA  vstupní koncentrace od 100 ng)

- příprava sekvenační knihovny WES: KAPA HyperCap workflow 3.3 (Roche)

  - více vzorků najednou

  - laboratoř ~ 3 dny

www.sequencing.roche.com

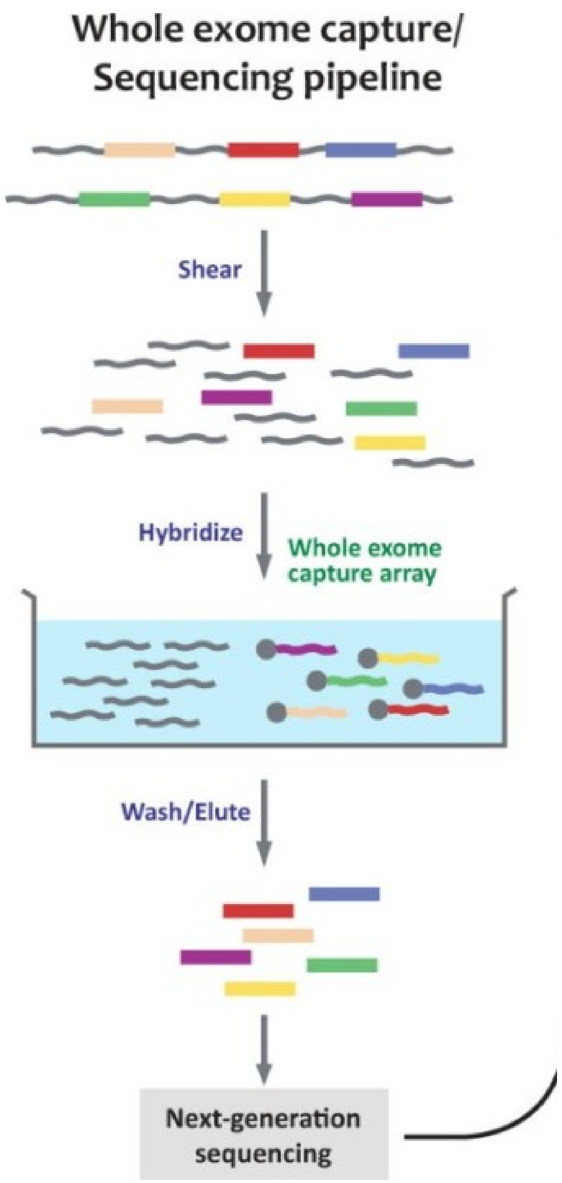
www.sequencing.roche.com

- vlastní proces sekvenování – CF CEITEC:

  sekvenátor „*NextSeq 500*“

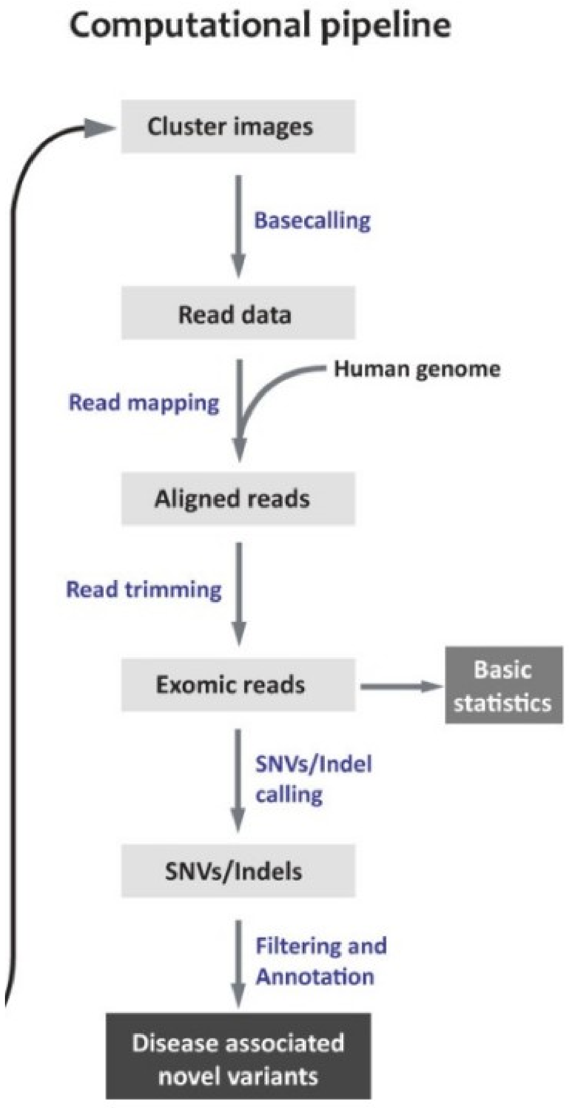
  - *hloubka čtení 30 x (pro 90 % dat)*

www.nextseq500.illumina.com



Gerald Goh et al., 2018

Bioinformatická analýza WES dat



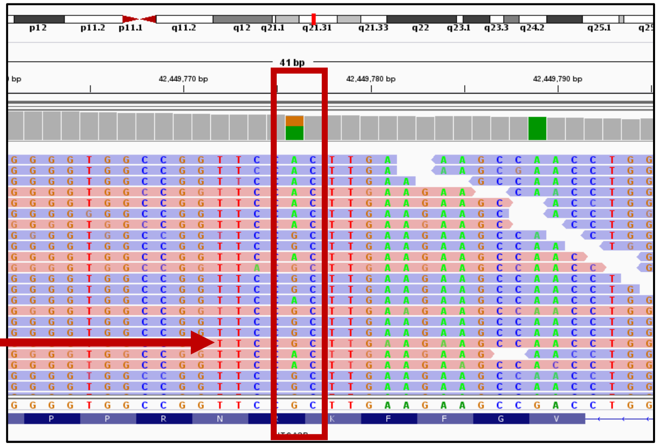
Gerald Goh et al., 2018

- zisk hodnotitelných genových dat – soubor dat ve formátu MS Excell

1/ jednonukleotidové záměny/krátké del, inzerce (SNV/ indel)

- DESÍTKY až STOVKY tisíc variant

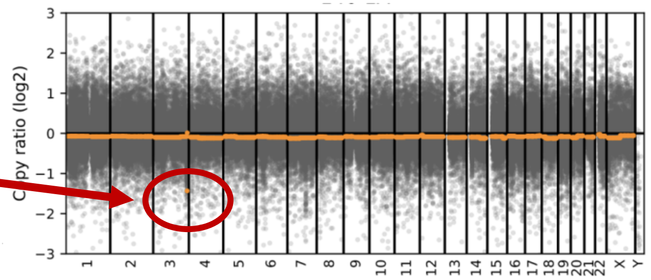
32541401	A	C	exonic	TMEM39B	nonsynonymous SNV	TMEM39B:NM_018
34066567	G	A	exonic	CSMD2	nonsynonymous SNV	CSMD2:NM_001281
35227466	A	C	exonic	GJB4	nonsynonymous SNV	GJB4:NM_153212:e
35334404	T	G	exonic	DLGAP3	nonsynonymous SNV	DLGAP3:NM_00108
36752687	A	G	exonic	THRAP3	nonsynonymous SNV	THRAP3:NM_00132
39775303	A	G	exonic	MACF1	nonsynonymous SNV	MACF1:NM_01209
42660679	C	A	exonic	FOXJ3	nonsynonymous SNV	FOXJ3:NM_0011988
46751369	G	A	exonic	LRRC41	nonsynonymous SNV	LRRC41:NM_00636
47717094	G	A	exonic	STIL	nonsynonymous SNV	STIL:NM_00104816
54433431	AA	-	exonic	LRRC42	frameshift deletion	LRRC42:NM_05294
67390438	C	T	exonic	WDR78	nonsynonymous SNV	WDR78:NM_02476
87038327	C	T	exonic	CLCA4	nonsynonymous SNV	CLCA4:NM_012128:
100661842	T	C	exonic	DBT	nonsynonymous SNV	DBT:NM_001918:ex
111861985	A	G	exonic	CHIA	nonsynonymous	CHIA:NM_00
143767778	T	A	exonic	PPIAL4G	nonsynonymous SNV	PPIAL4G:NM_0011
144853248	G	C	exonic	PDE4DIP	nonsynonymous SNV	PDE4DIP:NM_00135
145562938	G	A	exonic	ANKRD35	nonsynonymous SNV	ANKRD35:NM_0012
146398387	G	C	exonic	NBPF12	nonsynonymous SNV	NBPF12:NM_00127
146398425	C	A	exonic	NBPF12	nonsynonymous SNV	NBPF12:NM_00127
146400208	A	C	exonic	NBPF12	nonsynonymous SNV	NBPF12:NM_00127



Výstup z IGV (Intergrative Genomics Viewer)

2/ varianty v počtu kopií – rozsáhlé delece, inzerce (CNV)

chr19	60500	24448480	OR4F17,CCDS12024.1,PLPP2,MIER2,CCDS12025.1,THEG,C2CD4C,SHC2,ODF3L2,MADCAM1,CCD	-0.0716486	25.8706	6196	5778.16	p13.3p13.
chr19	27241374	58607116	rs719366,UQCRFS1,VSTM2B,POP4,PLEKHF1,C19orf12,RCV000305089,CCDS12419.1,URI1,CCDS1	-0.0848897	27.1737	7531	7009.65	q11q12q1
chr2	10500	90402011	FAM110C,rs876724,SH3YL1,CCDS42646.2,CCDS1639.1,FAM150B,CCDS86815.1,TMEM18,SNTG2,	-0.067463	25.8808	7233	6579.95	p25.3p25.
chr2	91403011	242183029	RP11-407P15.2,ANKRD20A8P,TEKT4,CCDS2006.1,MRPS5,ZNF514,CCDS42712.1,AC092835.2,PR	-0.0778446	25.6154	13377	12202.8	p11.2p11.
chr20	60500	30256738	DEFB125,DEFB126,DEFB127,DEFB128,DEFB129,DEFB132,CCDS12994.1,ZCCHC3,SOX12,NRSN2,T	-0.102997	28.2232	2100	1904.58	p13p12.3p
chr20	30812398	64333667	DEFB115,DEFB116,DEFB118,DEFB119,CCDS13178.1,DEFB121,DEFB123,DEFB124,REM1,CCDS131	-0.0579013	27.6977	4259	3926.4	q11.21q11
chr21	5011776	46699483	FP565260.4,FP565260.3,GATD3B,FP565260.1,FP565260.6,LOC102724219,H2BFS,SIK1B,CCDS826	-0.0916326	26.8286	2816	2561.39	p12p11.2p
chr22	10510500	21225562	OR11H1,POTEH,CCT8L2,XKR3,GAB4,CCDS13739.1,IL17RA,TMEM121B,HDHD5,CECR1,CECR2,SLC	-0.0388298	24.9613	833	749.646	p11.2p11.
chr22	21384368	50807968	RIMBP3B,HIC2,TMEM191C,UBE2L3,CCDS13790.1,YDJC,CCDS13791.1,CCDC116,SDF2L1,CCDS137	-0.0724246	27.6808	4596	4246.42	q11.21q11
chr3	10500	75235529	CCDS2556.1,rs1357617,CNTN6,CCDS2557.1;clinvar_rcv,CNTN4,CCDS2558.1,CCDS2559.1,IL5RA,	-0.0866071	26.106	7582	6941.97	p26.3p26.
chr3	75521083	196214520	FRG2C,ZNF717,CCDS77773.1,ROBO2,CCDS43109.1,RCV000367636,CCDS54610.1,ROBO1,CCDS4	-0.100597	26.4249	8163	7389.48	p12.3p12.
chr3	196217828	1,97E+08	SLC51A,CCDS3315.1;clinvar_rcv,PCYT1A,TCTEX1D2,	-1.38856	14.52	191	172.9	q29
chr3	197297755	198038677	BDH1,CCDS43195.1,RUBCN,FYTTD1,CCDS3329.1,CCDS3330.1,LRCH3,IQCG,CCDS3331.1,RPL35A,	-0.0498963	30.4774	106	97.1961	q29
chr4	10500	49336424	CCDS75075.1,ZNF595,CCDS75076.1,ZNF718,CCDS75078.1,ZNF732,CCDS33931.1,ZNF141,ZNF72	-0.079642	31.617	3335	3010.43	p16.3p16.
chr4	49708600	190204055	DCUN1D4,LRRC66,RCV000276019,RCV000594412,SGCB,CCDS3489.1,SPATA18,CCDS47053.1,USI	-0.108915	26.9924	7906	7143.06	p11q11q1
chr5	10500	47300085	PLEKHG4B,LRRC14B,CCDC127,CCDS3853.1,CCDS77992.1,CCDS58941.1,PDCD6,CCDS58940.1,CC	-0.0736269	29.6285	2545	2302.87	p15.33p15
chr5	49610214	181477759	EMB,CCDS3954.1,CCDS54849.1,PARP8,ISL1,PELO,ITGA1,ITGA2,CCDS3957.1;clinvar_rcv,MOCS2	-0.100991	27.5637	10044	9147.2	q11.1q11.
chr6	176244	59829434	CCDS4468.1,DUSP22,IRF4,EXOC2,HUS1B,FOXF2,RCV000173256,CCDS4474.1,GMDS,MYLK4,CCD	-0.0805845	27.2067	6781	6249.17	p25.3p25.
chr6	60230434	170745479	MTRNR2L9,KHDRBS2,FKBP1C,LGSN,CCDS4964.1,PTP4A1,CCDS4966.1,PHF3,EYS,CCDS47445.1,R	-0.0911381	27.2194	6955	6269.88	q11.1q11.
chr7	10500	65557936	CCDS47522.1;clinvar_rcv,FAM20C,RCV000001082,RCV000486633,WI2-2373I1.1,PDGFA,CCDS34	-0.123441	25.2854	4272	3828.5	p22.3p22.
chr7	65874074	159335473	VKORC1L1,CCDS5529.1,GUSB,CCDS5530.1,RCV000178059,CCDS47597.1,CCDS5531.1,CRCP,TPS1	-0.107266	26.3437	8597	7788.01	q11.21q11
chr8	60500	46964270	OR4F21,ZNF596,CCDS5952.1,FBXO25,CCDS5953.1,TDRP,CCDS47759.1,ERICH1,DLGAP2,RCV000	-0.0823049	27.422	3415	3072.95	p23.3p23.
chr8	47261535	145078136	CCDS43737.1,SPIDR,CCDS64890.1,CCDS64891.1,CCDS75734.1,PRKDC,MCM4,RCV000350595,RC	-0.109296	27.4199	5936	5350.37	q11.21q11
chr9	14813	45518058	WASHC1,FOXD4,CCDS6438.1,CBWD1,DOCK8,RCV000350034,CCDS6440.2,KANK1,CCDS6441.1,[	-0.0789011	27.2937	2945	2663.47	p24.3p24.
chr9	60519058	138122007	SPATA31A5,SPATA31A7,CH17-296N19.1,ANKRD20A4,FOXD4L5,CBWD5,CCDS75844.1,FOXD4L4	-0.0939655	27.3844	7835	7171.58	q12q13q2



Výstup z CNVkit

Hledání variant pro dané onemocnění

Která varianta je ta, která způsobí nemoc?

→ komparativní přístup indivuálně nastavený dle případu rodiny

- segregační analýza v rodinách
  - porovnání variant postižených pacientů a zdravých příbuzných
- předpoklad dědičnosti – autozomálně dominantní
  - autozomálně recesivní
  - X-vázaná
  - varianta *„de novo“*
- virtuální panely genů:
  1/ virtuální panely podle diagnózy
  2/ klinický exom (téměř 7000 genů)
- hodnocení v rámci celého exomu (20 000 genů)

Virtuální panel genů pro FHD (668 genů)

ABCA12	CLEC1B	GRB2	NAPG	PRKG2	SNAP25	VPS39	ACP5	CLCN7
ABCB4	CLEC4F	GRK5	NBEA	PTEN	SNAP29	VPS41	ADA	CLPB
ABCC4	CNO	GRK6	NFE2	PTGIR	SNAPIN	VPS4B	ADA2	COG1
ABCG5	CSK	GUCY1A3	NIPSNAP3A	PTGS1	SNX1	VPS52	ADAR	COG4
ACSL4	CTTN	GUCY1B3	NOX1	PTK2	SRA1	VPS8	ADH5	COG6
ACVRL1	DAAM1	HOOK3	NRG3	PTPN1	SRF	WDR66	AFG2A	COL4A5
ADCY3	DIAPH2	HPS1	NSF	PTPN12	STOM	ZFPMI	AGK	COMT
ADCY6	DIAPH3	HTR2A	NXF1	PTPN18	STX12	ATG2B	ALG12	CORIN
ADCY7	DNAH11	CHD3	P2RX1	PTPN2	STX2	ATM	ALG8	CR2
ADORA2B	DNM1L	INPP5D	P2RY1	PTPN6	STX4	BLM	AMN	CTLA4
ADRA2A	DNM2	ITGA5	P2RY13	PTPN7	STX6	CDAN1	ANKRD11	CTNNBL1
ADRA2B	DNM3	ITGB1	PADI2	PTPN9	STX7	CEBPA	APOE	CUBN
ADRBK1	EFNB1	ITPR1	PDE2A	PTPRA	STXBP1	DDX41	ARHGAP31	DCLRE1C
AK3	EPHA4	KIAA1109	PDE3A	PTPRC	STXBP3	EPCAM	ARHGEF1	DEF6
AKT1	EPHB1	KIAA2018	PDE4D	PTPRJ	STXBP4	GSKIP	ARPC1B	DGKE
AKT2	ERG	LAIR1	PDE5A	RAB27A	STXBP5L	HAX1	ARVCF	DGUOK
ALOX12	EXOC1	LPAR1	PDPK1	RAB27B	STXBP6	CHEK2	ASAH1	DHFR
ANKRD12	F2R	LTBP1	PDZD3	RAB38	SUZ12	MLH1	ASXL1	DLL4
ANKRD18A	F2RL3	LY6G6F	PDZK1	RAB4A	SYK	MSH2	ATP6AP1	DNAJC21
ANKRD18B	FARP2	LYN	PEAR1	RABGGTA	SYTL3	MSH6	ATP6V1B2	DNASE1
ANKRD33	FCER1G	MAP2K2	PECAM1	RAC1	SYTL4	NBS1	ATP7B	DOCK2
AP3D1	FERMT1	MAP2K4	PGM3	RAI1	TAL1	NF1	ATRX	DOCK6
AP3M1	FGD3	MAP3K9	PHOX2A	RAP1B	TAOK1	PAX5	BANK1	DZIP1L
AP3S1	FGR	MAPK1	PIK3CA	RAP1GAP	TEC	PMS2	BCR	EFL1
APC	FHOD1	MAPK13	PIK3CB	RAP1GAP2	TGFBR3	RBBP6	BLK	ELF4
ARHGAP1	FLII	MAPK14	PIK3R1	RAP1GDS1	TLN1	RECQL2	BRAF	ENPP1
ARHGAP17	FMNL1	MAPK8	PIK3R3	RGS10	TLR2	RECQL4	BTNL2	EOGT
ARHGAP32	FMNL3	MDS1	PIK3R5	RGS18	TMCC2	RPL23	C3	EPB42
ARHGAP6	FRMPD1	MKL1	PLA2G4C	RGS19	TPM1	RPL36	C4A	EPHB2
ARHGDIA	FYB	MLK1	PLCB2	RGS20	TPM4	RPS15	C4B	ERBB3
ARHGDIB	FYN	MLPH	PLCB3	RGS9	TRAF4	RPS27A	CA2	ERCC6L2
ARHGEF12	GDI2	MMP17	PLCG2	RHOA	TREML1	SLC25A38	CALR	ESCO2
ARHGEF3	GFI1	MNX1	PLDN	RHOC	TRPM7	SRP72	CASP10	FARS2
ARRB1	GNA12	MRPS34	PPP1CA	RHOF	TTC37	STN1	CD109	FAS
ASPN	GNA13	MUC16	PPP1CB	ROCK1	TTF2	F2	CD19	FASLG
BAK1	GNAI1	MUC2	PPP1CC	ROCK2	TUBA3C	F5	CD40LG	FCGR2B
BCL2L1	GNAI2	MUTED	PPP1R12A	SCAMP2	UNC13A	MTHFR	CD46	FCGR2C
BET1L	GNAQ	MYB	PPP1R12C	SCAMP5	UNC13B	PROC	CD55	FCGR3B
BLOC1S1	GNAZ	MYH10	PPP1R14A	SCFD1	VAMP2	PROS1	CD81	FIP1L1
BLOC1S2	GNB2	MYH13	PPP1R2	SELP	VAMP3	F8	CDC40	FLT1
BLOC1S4	GNB3	MYL9	PRKACA	SERPINE2	VAMP7	F9	CDC42	FOCAD
BMP4	GNE	MYLK	PRKACB	SIRPA	VAMP8	F11	CFB	FOXP3
BTBD9	GNG11	MYLK2	PRKAR2A	SLC35D3	VAV1	ABCA1	CFH	FYB1
C14orf133	GNG12	MYO18B	PRKCA	SLC9A3R1	VAV2	ABCC6	CFHR1	GALC
C19orf55	GNG13	MYO3A	PRKCB	SLC9A3R2	VAV3	ABCD4	CFHR3	GBA1
C20orf42	GNG5	MYO5A	PRKCQ	SMAD1	VPS11	ABL1	CFI	GIMAP5
C6orf25	GP5	MYO5B	PRKD1	SMAD6	VPS16	ACAD9	CIITA	GNA14
CD226	GRAP2	NAPA	PRKG1	SNAP23	VPS18	ACAT1	CISD2	GNAS

GUCY1A1	LRBA	PHGDH	RREB1	TBL1XR1
HEATR3	LSM11	PIGA	RYR1	TBX1
HELLPAR	LZTR1	PKHD1	SALL4	TBXAS1
HIRA	MADD	PLAU	SAMHD1	TCIRG1
HLA-B	MAGT1	PLEKHM1	SARS2	TCN2
HLA-DQA1	MAP2K1	PLOD3	SASH3	TET2
HLA-DQB1	MARS1	PML	SAT1	TFRC
HLA-DRB1	MECP2	PMM2	SC5D	TGFB1
HLCS	MED12	PNP	SCARB2	THBD
HMGCL	MGAT2	POLRMT	SCN10A	TLR7
HMOX1	MMAA	POMP	SCN11A	TLR8
HPS3	MMAB	PPIL1	SCN9A	TMEM165
HPS5	MMACHC	PRDX1	SEC24C	TNFAIP3
HPS6	MMUT	PRF1	SF3B1	TNFRSF13B
HSCB	MOGS	PRIM1	SH2D1A	TNFRSF13C
ICOS	MPIG6B	PSAP	SKIC2	TNFSF11
IFIH1	MRAS	PSMB4	SKIC3	TNFSF12
IFNG	MS4A1	PSMB8	SLC19A2	TNFSF4
IFNGR1	MTHFD1	PSMB9	SLC20A2	TNIP1
IGHG1	MTOR	PSTPIP1	SLC35A1	TOM1
IKZF5	MVK	PTPN22	SLC37A4	TPP2
IL10	MYORG	PXK	SLC39A7	TREX1
IL6ST	MYSM1	RAG1	SLC46A1	TRNT1
IL7R	NAA10	RAG2	SLC7A7	TTC7A
IRAK1	NABP1	RARA	SLF2	TUBA8
IRF2BP2	NBN	RASA2	SMARCAL1	TYMS
IRF5	NFKB1	RASGRP1	SMARCD2	UBA1
IRF8	NFKB2	RBPJ	SMC5	UBE2L3
ITGAM	NHEJ1	RECQL	SMPD1	UFD1
ITK	NIPBL	REL	SNX10	UNC13D
IVD	NLRC4	RFX5	SOCS1	UQCRFS1
JAM2	NLRP3	RFXANK	SOS1	UROS
JAZF1	NOS3	RFXAP	SOS2	USB1
KARS1	NPM1	RIT1	SP110	USP18
KCNJ1	NRAS	RNASEH2A	SPP1	VPS45
KCNN4	NSUN2	RNASEH2B	SPRED2	WARS2
KDM6A	NUMA1	RNASEH2C	SRP54	WDR1
KIAA0319L	OCLN	RNU7-1	SRSF2	WFS1
KIF15	OCRL	RPL18	STAT1	WIPF1
KIT	OSTM1	RPL35	STAT2	XIAP
KMT2D	OTUD5	RPL8	STAT3	XPR1
KRAS	P4HA2	RPL9	STAT4	ZAP70
LACC1	PCCA	RPS14	STAT5B	ZBTB16
LARS2	PCCB	RPS15A	STING1	ZNFX1
LBR	PDCD1	RPS20	STOX1	
LCK	PDGFB	RPSA	STT3B	
LIPA	PDGFRB	RRAS	TALDO1	
LMBRD1	PEPD	RRAS2	TBC1D24	

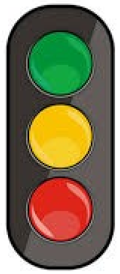
Hodnocení a klasifikace WES variant

- vybrané varianty hodnotíme v populaci: GmoAD, ClinVar, A-C-G-T české genomy (https://database.acgt.cz/)

- *in silico* analýza variant pomocí nástrojů:

  - prediktory (Align GVGD, REVEL, SIFT, ...)
  - softwary, databáze (Alamut, VarSome, HGMD, OMIM)
  - krystalografická analýza

- klasifikace klinického významu variant (ACMG/AMP)



Třída 1 – benigní

Třída 2 – pravděpodobně benigní

Třída 3 – VUS – varianty nejasného klinického významu

Třída 4 – pravděpodobně patogenní

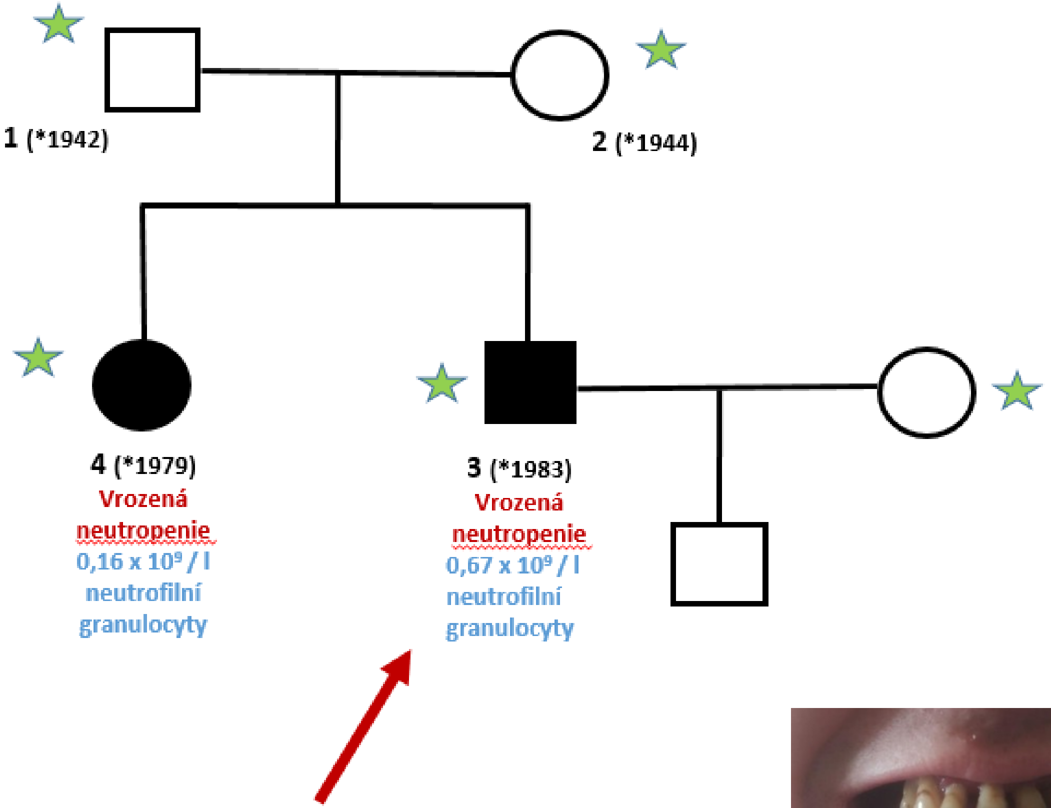
Třída 5 – patogenní

→

- klinicky významná zárodečná varianta
- verifikace další nezávislou metodou

Kazuistika – dědičná neutropenie u sourozenců

- Sestra probanda: 4, ročník 1979
- od 12 let časté záněty středního ucha, kožní infekce a záněty dásní
- stomatologické obtíže – kariézní chrup s nutností vícečetných extrakcí a náhrad implantátem
- KO: středně těžká až těžká neutropenie



- Proband: 3, ročník 1983

- od 10 let sledován pro neutropenii
- opakované záněty středního ucha – ve 14 letech operace levého ucha, v 15 letech pravého ucha
- v 18 letech incize pro hýžďový absces I.sin.
- v 19 letech mononukleóza
- ve 23 letech po terapii AIHA v důsledku epizod autoimunitní hemolytické anémie
- recidivující infekty ORL oblasti
- kariézní chrup, spodní můstky
- nekuřák

- **WES analýza: obou sourozenců a jejich rodičů**

Defektní chrup probanda - gingividita, stomatitida

Kazuistika – dědičná neutropenie u sourozenců

- <u>WES:</u> segregační analýza - virtuální panel genů pro neutropenie
  segregační analýza - celý exom

- záchyt v *SBDS* genu: <u>c.355T>C / c.536C>T</u>
  maternální alela / paternální alela

varianta c.355T>C;p.(Cys119Arg) **pravděpodobně patogenní**	varianta c.536C>T; p.(Pro179Leu) **nová**, raritní varianta typu

→ SHWACHMAN-BODIAN-DIAMOND sy
(AR onemocnění – insuficience pankreatu, kostní malformace, anomálie jater)

→ *funkční testování SBDS variant na úrovni proteinu*

- pacienti: infekce, neutropenie
- až 30 % riziko rozvoje hematol. malignit (MDS/AML)

- upřesnění diagnózy
- pravidelné hematologické sledování na IHOKu: kvůli riziku rozvoje MDS či akutní leukémie
- analýza rodinných příslušníků – potomci jsou zdraví přenašeči této nemoci

Kde lze dále využít WES

- ❖ různé diagnózy – genetická pracoviště: mentální retardace, svalové dystrofie, epilepsie, syndromy, neznámé příčiny onemocnění

- ❖ analýza somatického exomu u pacientů s B-prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukemií (standardní CELL chemoterap. protokoly, Blina-CELL, Pona-CELL)

AZV ČR AGENTURA PRO ZDRAVOTNICKÝ VÝZKUM ČESKÉ REPUBLIKY - projekt v letech 2022 – 2025 (ÚHKT / IHOK FNB / ÚLGG MU)

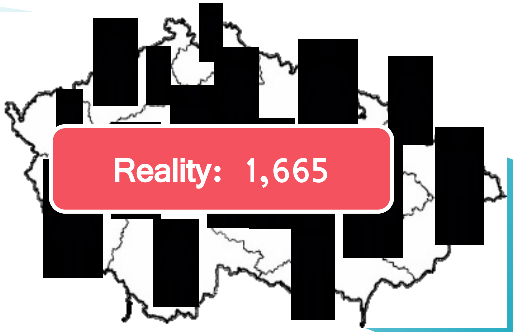
- vstupní vzorky: z data diagnózy x vzorku z remise (MRD negativní)

- nastavení metodiky pro rozšířené sledování pacientů s rozvojem ALL

4. Celogenomové sekvenování

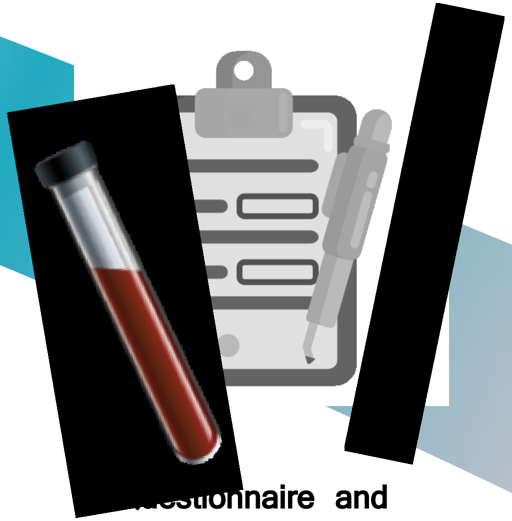
Analysis of Czech Genomes for Theranostics

(A-C-G-T)



Reality: 1,665

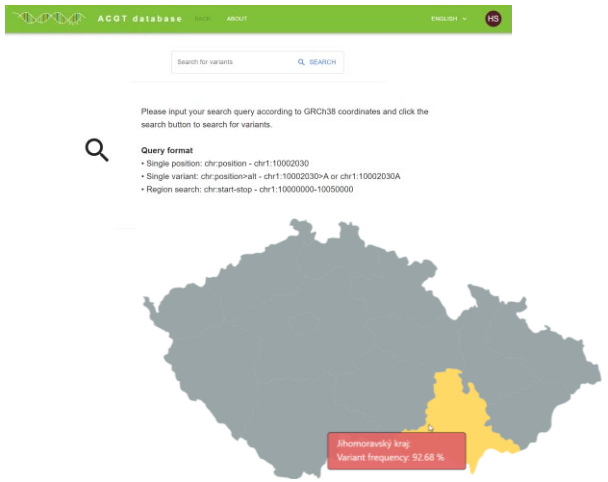
Plan: 1,500 healthy
Czechs from all regions



[redacted]estionnaire and
blood sample collection,
DNA isolation

Reality: 1,325

Plan: 1,000+ genomes
sequencing

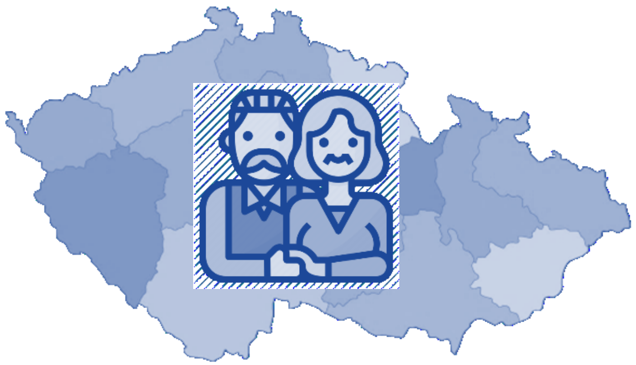


Database of variant frequencies at
individual positions in the genome
(gnomAD-like browser)

1

30 to 55 years old, male & female

2

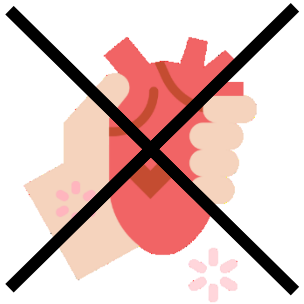


Father comes from the same Czech region as mother

3

Healthy
(No genetic disorders)

4



NOT a transplant recipient

5

NOT a recipient of blood transfusion (in last 6 months)

6

NOT a pregnant woman

Příprava knihoven

- PCR-free (minimální technický bias, bez PCR chimér a chyb)
  - 1000 ng DNA na vstupu
- KAPA Hyperprep kit nebo Illumina TruSeq DNA PCR-free
- Kvantifikace pomocí qPCR (KAPA Library Quantification Kit)
- Elektroforéza produktu z qPCR

Library preparation and sequencing

- PCR-free library preparation (minimal technical bias)
- Illumina NovaSeq
- Paired-end 2×150 bp
- Average coverage: 30x

Tým řešitelů
Jak se zapojit
Genografická analýza
Analýza českých genomů pro teranostiku
CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448
Projekt Analýza českých genomů pro teranostiku (zkráceně A-C-G-T; teranostika = terapie + diagnostika) je zaměřen na sestavení kontrolní databáze genetické informace typické pro českou populaci. Cílem projektu je přispět k včasné a přesné diagnostice genetických onemocnění a v jejich dalším výzkumu.
Za tímto účelem sbíráme vzorky jedinců ze všech krajů České republiky s cílem prozkoumat genetickou informaci 1000 Čechů.
Informace o tom, jak se zúčastnit, najdete v sekci "Informace pro účastníky projektu", "Jak se zapojit", "Odběrová místa" a "Formuláře ke stažení".

www.ACGT.cz

Variant search

Vyhledej varianty

chr3:100600000-100665000 HLEDAT

Show column filtering

Position	Reference	Alternate	rs ID	ACGT Czech Repu…	Gene	Consequence	Hlavní město Praha	Jihomora…
chr3:100663297	T	A	rs1185983	100 %	ADGRG7	intron_variant	0	100
chr3:100663657	C	T	rs1184855597	2.08 %	ADGRG7	intron_variant	0	2.44
chr3:100663664	C	G	rs1165536	89.58 %	ADGRG7	intron_variant	0	92.68
chr3:100663699	G	C	rs1165535	100 %	ADGRG7	intron_variant	0	100
chr3:100664080	A	T	rs149091956	2.08 %	ADGRG7	intron_variant	0	2.44
chr3:100664091	T	A	rs143120819	2.08 %	ADGRG7	intron_variant	0	2.44
chr3:100664325	G	A	rs556952085	2.08 %	ADGRG7	intron_variant	0	2.44
chr3:100664363	C	G	rs752177664	2.08 %	ADGRG7	intron_variant	0	2.44
chr3:100664458	C	G	rs1165534	43.75 %	ADGRG7	intron_variant	0	46.34
chr3:100664507	A	G	rs115180895	2.08 %	ADGRG7	intron_variant	0	2.44
chr3:100664852	A	T	rs143384523	4.17 %	ADGRG7	intron_variant	0	4.88
chr3:100664895	A	C	rs2449250	100 %	ADGRG7	intron_variant	0	100

Select columns to display

Variant data

- Position
- Reference
- Alternate
- rs ID
- ACGT Czech Republic frequency
- gnomAD global frequency
- gnomAD Non-Finnish European frequency
- Gene
- Consequence
- Region
- Sex frequency
- Genotype
- Annotation

Region frequencies

- Hlavní město Praha
- Zlínský kraj

Restore defaults Save

ACGT database BACK ABOUT

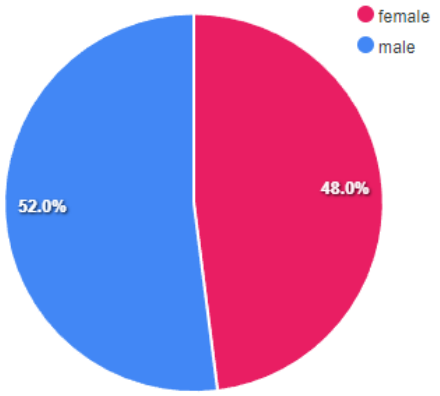
Basic information

Position	chr11:46739505
Reference	G
Alternate	A
rs ID	rs1799963&CR961726
ACGT Czech Republic frequency	0.0123
gnomAD global frequency	
gnomAD Non-Finnish European frequency	
Consequence	3_prime_UTR_variant
Total alleles count	2032

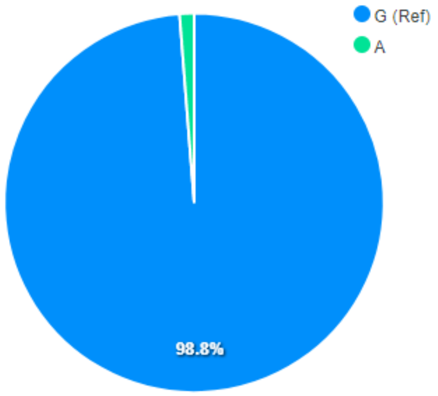
Show full annotation   Show region frequencies

Frequency charts

Variant occurence by sex



Global allele frequency



F2:prothrombin mutation c.*97G>A

A-C-G-T AF: 1.23%

gnomAD AF v2.1.1: 1.24%

Region frequency info

x

Total alleles: 2032

Region	Frequency	Allele count	Total alleles
Hlavní město Praha	0.0139	3	216
Jihočeský kraj	0.0208	1	48
Jihomoravský kraj	0.00599	2	334
Karlovarský kraj	0	0	30
Královehradecký kraj	0.00746	1	134
Liberecký kraj	0.0385	2	52
Moravskoslezský kraj	0.0229	5	218
Olomoucký kraj	0.00575	1	174
Pardubický kraj	0	0	76
Plzeňský kraj	0.0377	4	106
Středočeský kraj	0	0	234
Ústecký kraj	0.0208	3	144
Vysočina	0.00909	1	110
Zlínský kraj	0.00658	1	152

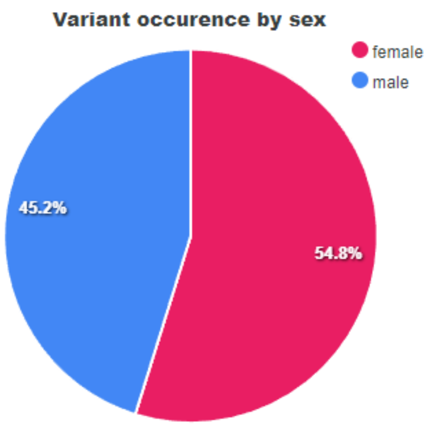
ACGT database BACK ABOUT

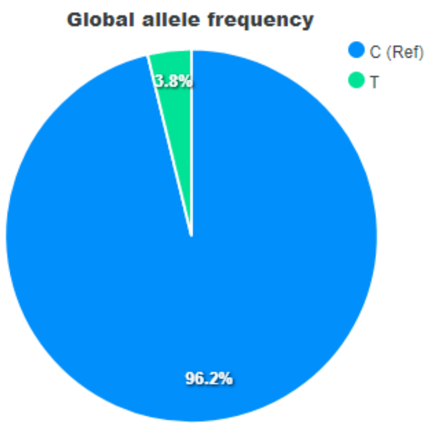
Basic information

Position	chr1:169549811
Reference	C
Alternate	T
rs ID	rs6025&CM940389
ACGT Czech Republic frequency	0.0379
gnomAD global frequency	
gnomAD Non-Finnish European frequency	
Consequence	missense_variant
Total alleles count	2032

Show full annotation   Show region frequencies

Frequency charts





F5: Leiden mutation c.1601G>A

A-C-G-T AF: 6.00%

gnomAD AF v2.1.1: 8.40%

Region frequency info x

Total alleles: 2032

Region	Frequency	Allele count	Total alleles
Hlavní město Praha	0.0648	14	216
Jihočeský kraj	0.0208	1	48
Jihomoravský kraj	0.0329	11	334
Karlovarský kraj	0.0667	2	30
Královehradecký kraj	0.0224	3	134
Liberecký kraj	0.0577	3	52
Moravskoslezský kraj	0.0321	7	218
Olomoucký kraj	0.0115	2	174
Pardubický kraj	0.0395	3	76
Plzeňský kraj	0.0377	4	106
Středočeský kraj	0.0513	12	234
Ústecký kraj	0.0347	5	144
Vysočina	0.0364	4	110
Zlínský kraj	0.0329	5	152

Iniciativa „Milion evropských genomů do roku 2022“

tzv. „1+ Million Genomes“ & „Beyond 1 Million Genomes“

10. dubna 2018 se ČR stala jedním z 13 zakládajících signatářů deklarace o spolupráci „Towards access to at least 1 million sequenced genomes in the EU by 2022“.

Cílem iniciativy je zlepšit genetickou diagnostiku v celé Evropě, a to nastavením jednotných pravidel a vytvořením podrobného referenčního souboru dat. V současné době např. pacientskou DNA můžeme srovnávat pouze s celoevropskou referenční databází, ve které je **středoevropská populace jen velmi málo zastoupena**.

K dnešku deklaraci podepsalo **22 členských států EU, Velká Británie a Norsko**. Aktuálně se společnými silami připravují pravidla a technická infrastruktura, která od roku 2022 umožní sdílet hladce, legálně a bezpečně a celý 1 milion genomů.

Bohužel, průzkumy v jednotlivých zemích ukázaly, že **genomů v Evropě nemáme osekvenováno dost** – tedy pouze polovinu cíle. Například **ČR dosud může přispět pouze cca 1 5000 genomy z projektu „A-C-G-T“**. Proto byl zahájen mezinárodní projekt **Genome of Europe**, jehož cílem je přečíst **půl milionu chybějících genomů**.

Očekává se, že **každá z členských zemí se bude na projektu podílet proporčně** dle počtu obyvatel. **Pro ČR to znamená přečíst DNA dalších 16 775 lidí.** Počítáme-li, že osekvenování genomu stojí cca 40 000 Kč (+ personální a provozní náklady), znamená to investici cca **750 milionů Kč.**

Příklady sekvenování a financování v jiných státech:

Velká Británie: Již přečteno 100 tisíc genomů společností Genomics England (založena a vlastněna Ministerstvem zdravotnictví a sociální péče UK). Projekt byl financován z více zdrojů, zejména z NIHR a NHS England.

Litva: Dosud osekvenováno 1570 genomů, v novém projektu osekvenují dalších 1 500 genomů, podpořeno Ministerstvem zdravotnicví Litvy, financováno z RRF.

Dánsko: Funguje zde tzv. „Danish National Genome Center“, což je instituce spadající pod Ministerstvo zdravotnictví. Do roku 2024 plánují osekvenovat 64 tisíc genomů.

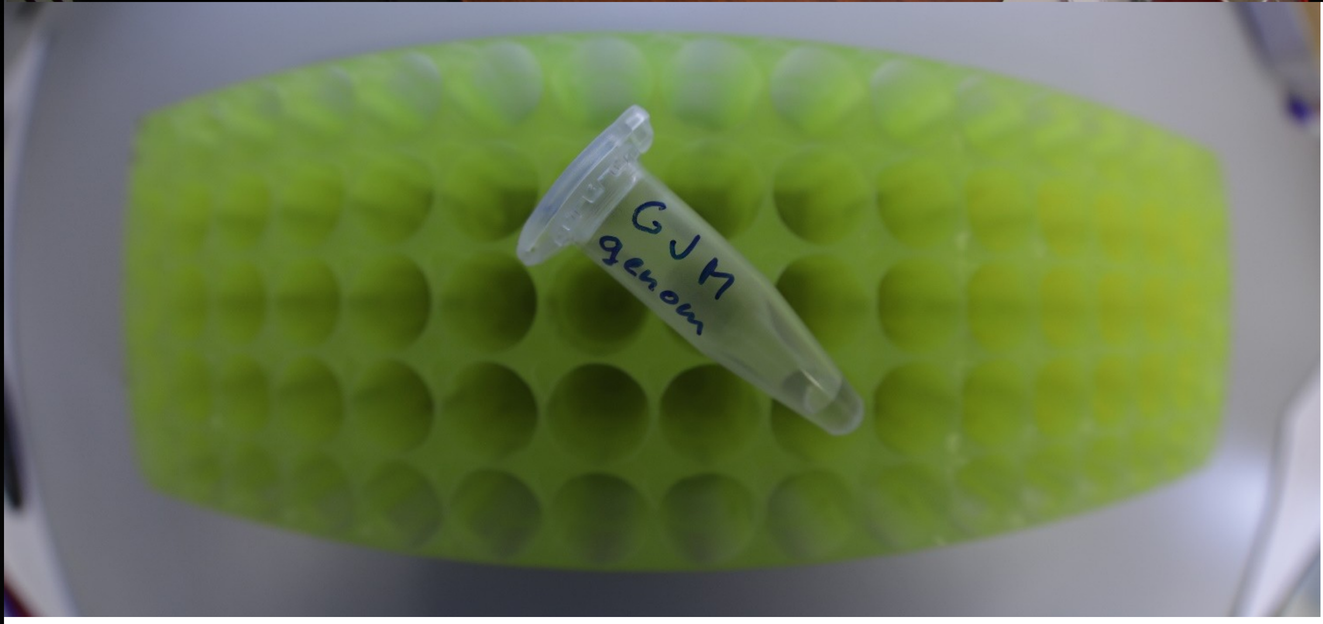
www.b1mg-project.eu

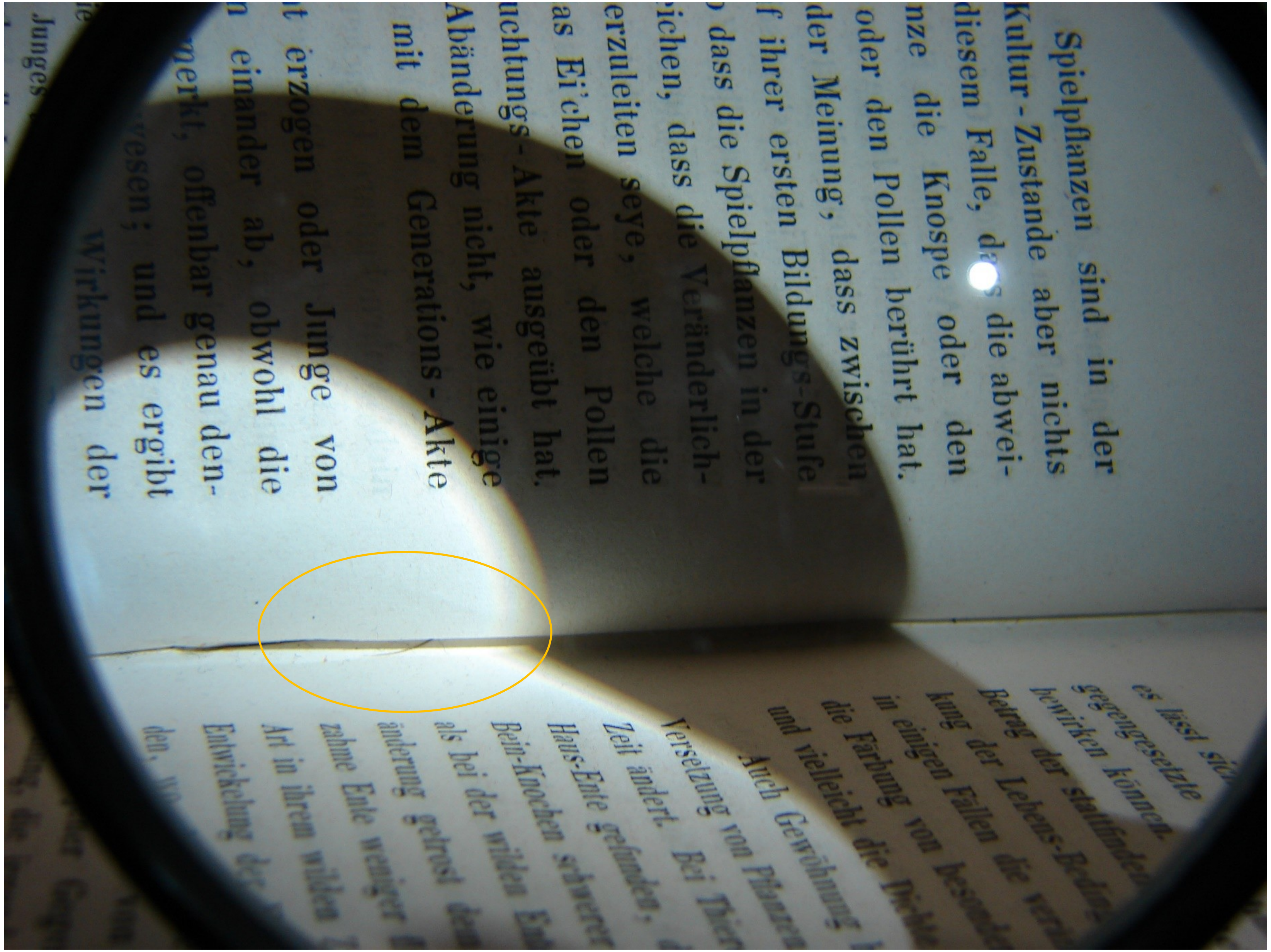
Honouring Gregor Johann Mendel legacy

Popis projektu

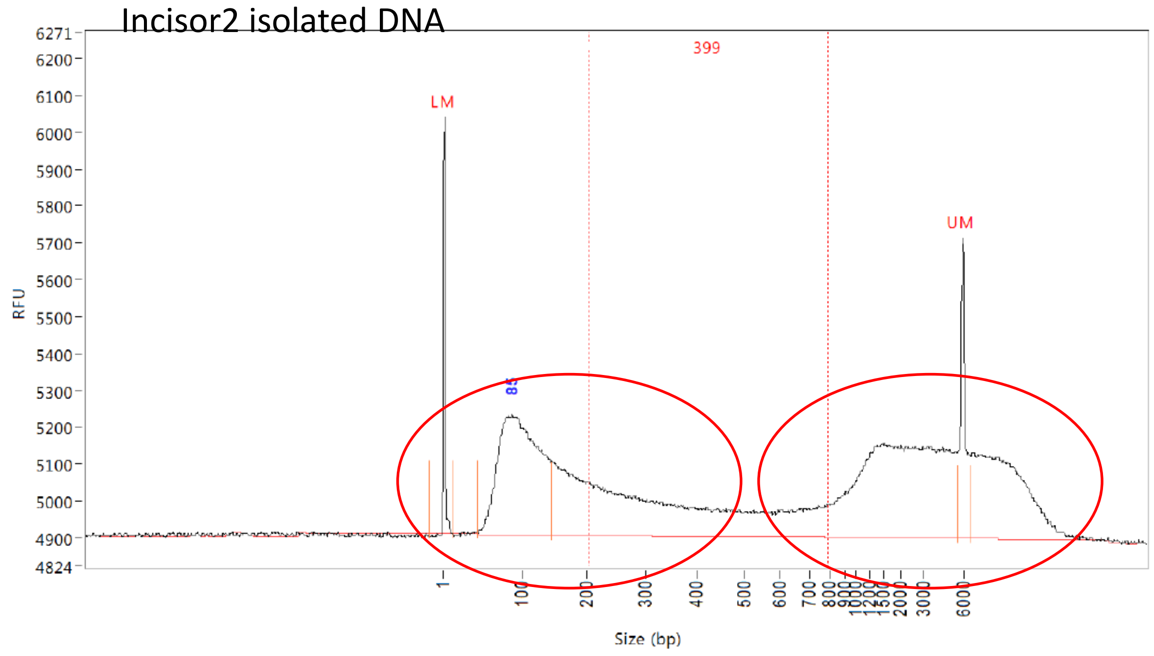
- Unikátní multidisciplinární spolupráce mezi laboratořemi archeologie, antropologie a genetiky Masarykovy univerzity za podpory Mendelova muzea, augustiniánského opatství a dalších subjektů.

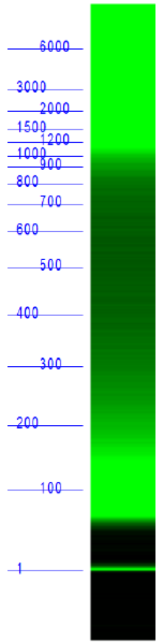
- Projekt zahrnuje archeologickou a antropologickou dokumentaci, 3D skenování ostatků, obličejovou superprojekci, sekvenování genomu…


GJM
genom



Ancient (starověká) DNA

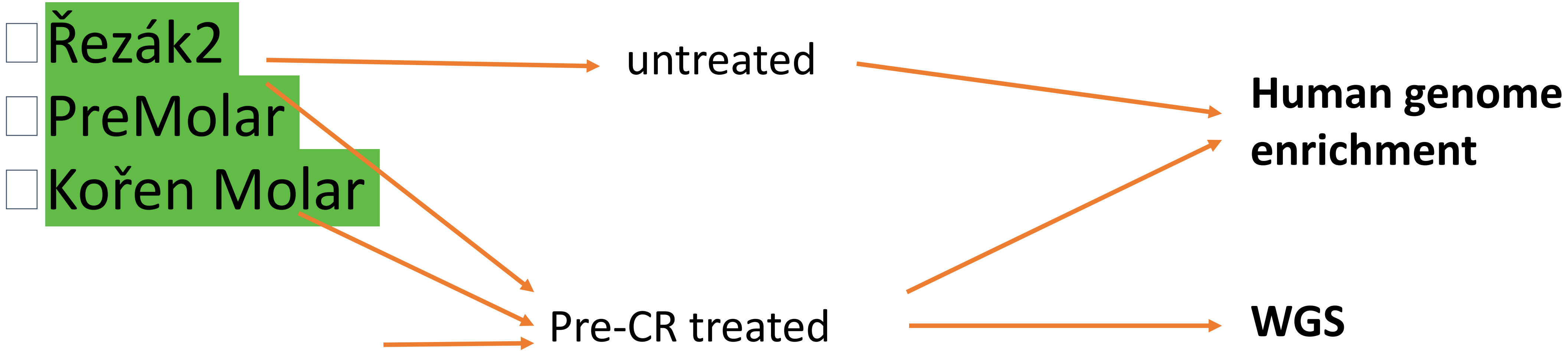




- izolovaný v laboratoři LBMA
- lidská DNA
- výtěžek v jednotlivých nanogramech
- délka fragmentů aDNA koreluje s velikostí nukleozomů
- aDNA je většinou zachována v tvrdých tkáních – kosti, zuby

M U N I

Sample_Name	Library_ID	Lane	Colour	SeqType	Organism	Strandedness	UDG_Treatment	R1	R2	BAM
GJM	GJMP2	1	2	PE	Human	double	Full	/mnt/shared/GJM/ra	/mnt/sl	NA
GJM	GJMP2	2	2	PE	Human	double	Full	/mnt/shared/GJM/ra	/mnt/sl	NA
GJM	GJMP4	1	2	PE	Human	double	Full	/mnt/shared/GJM/ra	/mnt/sl	NA
GJM	GJMP4	2	2	PE	Human	double	Full	/mnt/shared/GJM/ra	/mnt/sl	NA
GJM	GJMP5	1	2	PE	Human	double	Full	/mnt/shared/GJM/ra	/mnt/sl	NA
GJM	GJMP5	2	2	PE	Human	double	Full	/mnt/shared/GJM/ra	/mnt/sl	NA
GJM	Aug_zub2	1	2	PE	Human	double	none	/mnt/shared/GJM/ra	/mnt/sl	NA

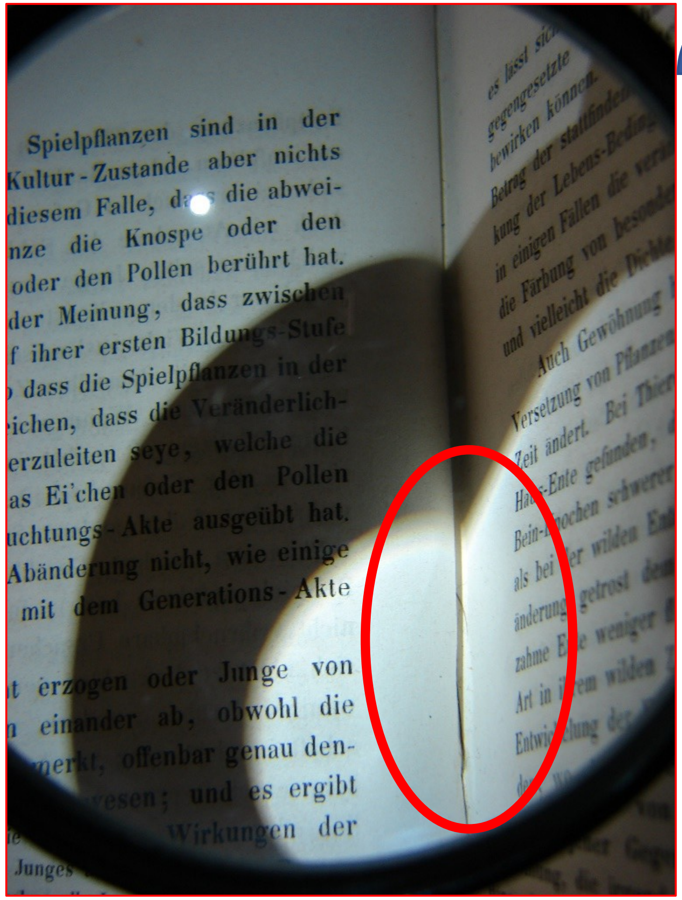


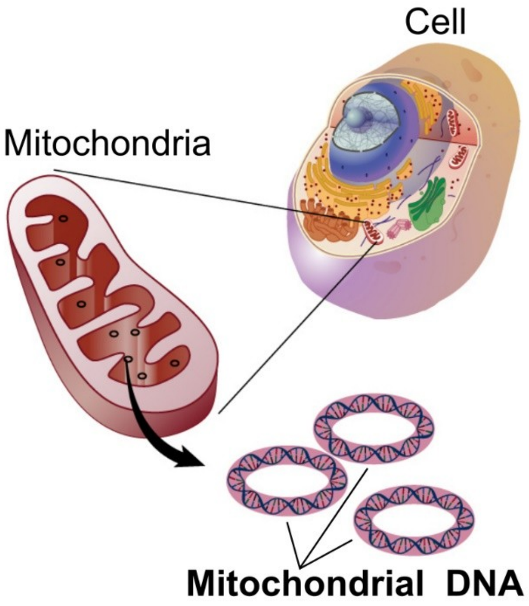
GJMP2	Zub	Třenový levý dolní
GJMP4	Zub	Řezák pravý dolní
GJMP5	Zub	Kořen horní
Aug_zub2	Zub	Špičák levý dolní

mtDNA sekvenování

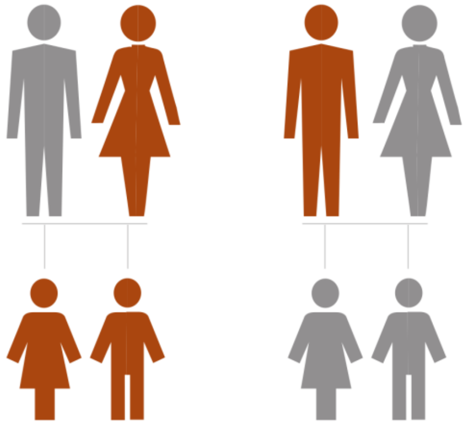
- pro potvrzení totožnosti kosterních pozůstatků
- pro kontrolu kontaminace vzorků

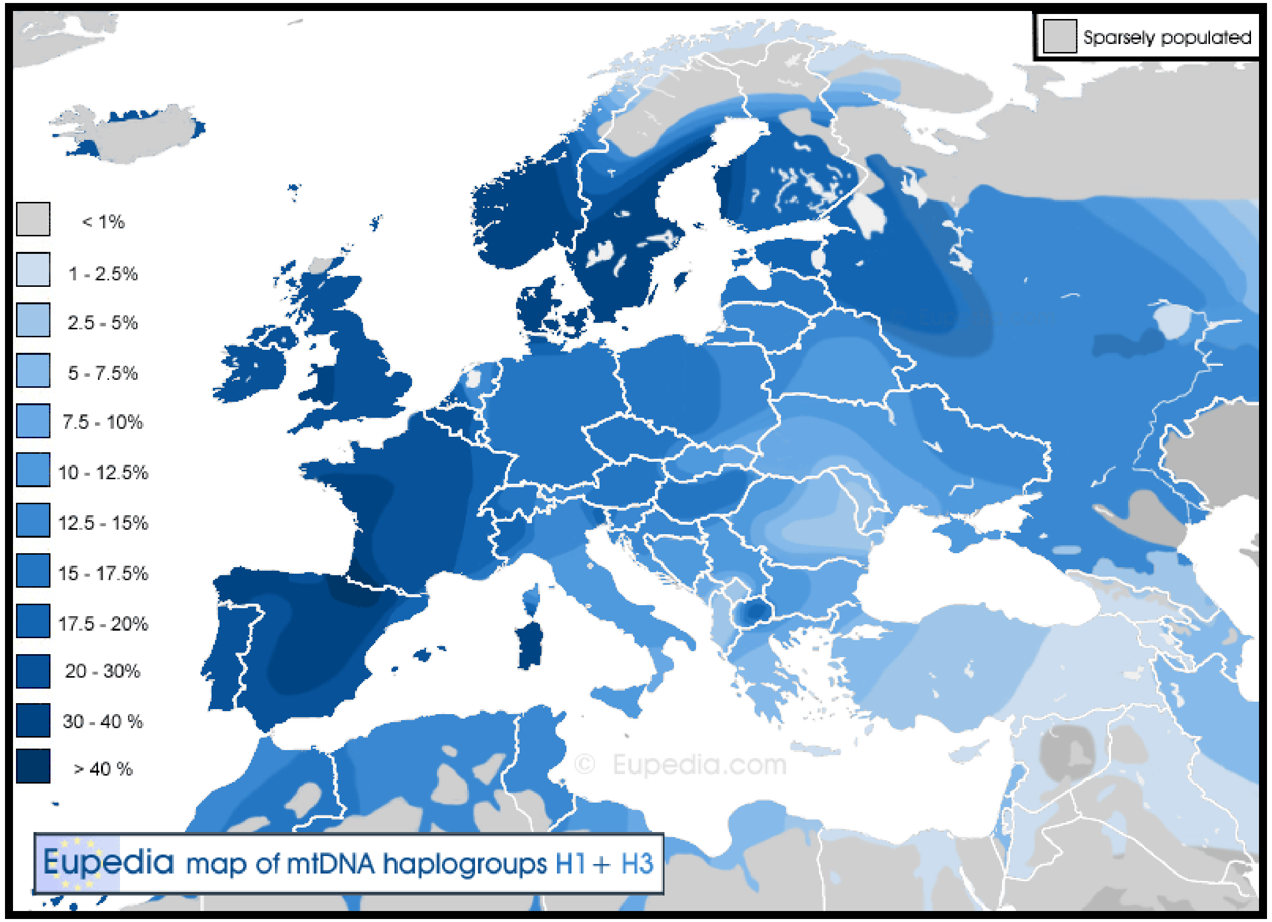
Hair *vs* teeth





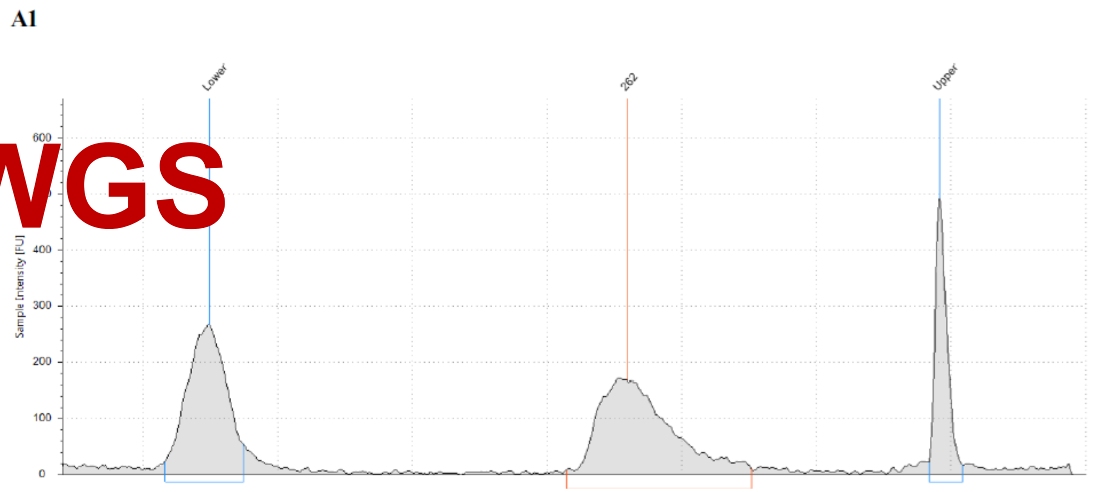
mtDNA haploskupina





- Zděděno v mateřské linii
- Mitochondriální genom lze použít ke sledování našich předků
- Mendelův haplotyp: H1c

Příprava knihovny WGS



- Použité sady a chemie
- Vzorky izolované pomocí PrepFiler Forensic DNA extrakční soupravy (ThermoFisher), koncentrované pomocí odstředivých kolon Amicon
- Swift 2S, adaptéry UMI (IDT), EvaGreen qPCR (aby se zabránilo přecyklování)
- NGS panely: xGen Human mtDNA panel (IDT), obohacení celého genomu MyBaits (Arbor biosciences)

Analýza surových dat

Mendel´s genome variants
from ancient DNA

Number of variant	4055755
SNP	3451370
INDEL	616443

Healthy men´s genome variants
from project ACGT

Number of variant	5011574
SNP	4074195
INDEL	942417

- Intron variants in majority, ~30K variant in gene coding regions

MUNI

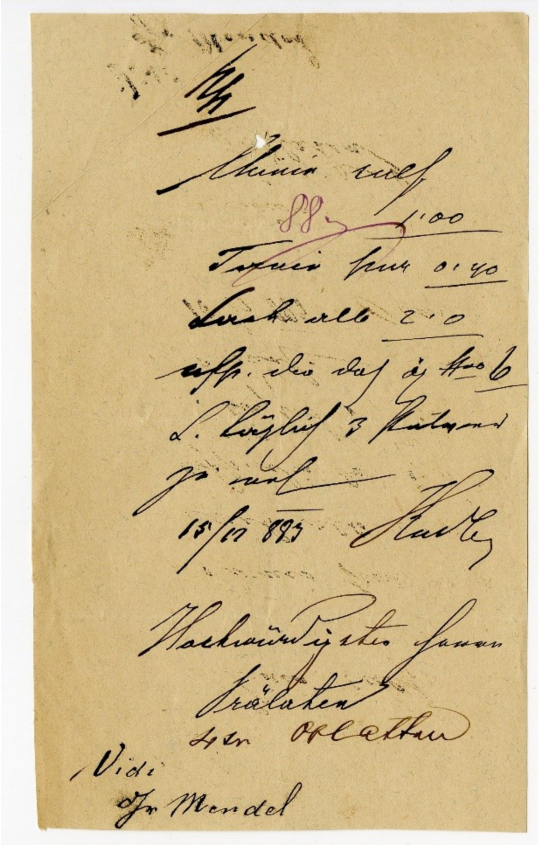
Mendel´s variant evaluation

➢ <u>setting parameters for evaluation of variants:</u>

- variant coverage ≥ 3 reads
- variant present in at least 2 unique DNA molecules
- variant allele frequency (VAF) ≥ 30%
- relevance in ClinVar, dbSNP (rs), PubMed
- variant effect prediction software: Alamut, VarSome, etc.
- disease related variants: HGMD, OMIM

MUNI

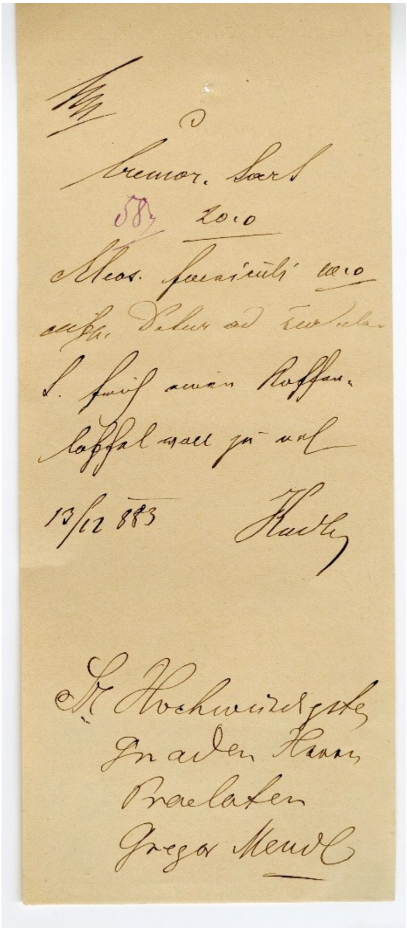
Mendel's medical condition



- character: „silent, shy, timid, psychically unstable“

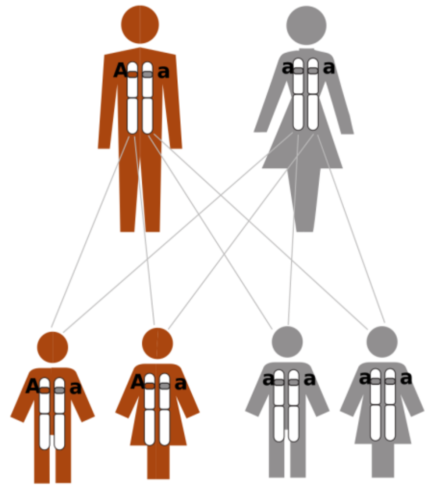
  Suffering from depressions? (DeCastro 2016)

- prone to obesity, smoker (>20 cigars/day)
- in his last years, he was suffering from „Bright's disease“ (a kidney disease in 19th century)
- swelling of lower limbs (edema)
- hypertension
- cardiac hypertrophy proven by autopsy



His prescriptions include Digitalis and Cremor Tartari (as a diuretic), Salicylate, Morphium, Chinin, Potassium

Autozomálně dominantní dědičnost



- ***KCNJ2* gene:** c.431G>C; p.(G144A): NM_000891.3
- heterozygous state
- disease-causing variant associated with Andersen-Tawil syndrome
- varying degrees of cardiac and muscle involvement, variable phenotype
  (cardiac arrhythmia, long QT syndrome)

(Ballester LY et al. 2006, Hum Mutat)

https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/17183-long-q-t-syndrome-lqts

ABO Blood Group System

- *ABO* **gene (9q34.2)** – 7 exons
- **O PHENOTYPE -** deletion of guanine at nucleotide 261 of *ABO* gene
- **A/B POLYMORPHISM -** several nucleotide differences between the alleles that code for the A and B glycosyltransferase enzymes

Yamamoto et al., 1990, J. Biol. Chem.

Exon	6		7														
Nucleotide Position	261	297	467	526	646	657	681	703	771	796	802	803	829	871	930	1054	1060
A alleles																	
A101	G	A	C	C	T	C	G	G	C	C	G	G	G	G	G	C	C
A102	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A201	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	Δ
A301	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*
Ax01	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B alleles																	
B101	*	G	*	G	*	T	*	A	*	A	*	C	*	*	A	*	*
B301	*	G	*	G	*	T	*	A	*	A	*	C	*	*	A	T	*
AB alleles																	
cis-AB01	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*
B(A)01	*	G	*	G	*	*	*	*	*	A	*	C	*	*	A	*	*
O alleles																	
O02	Δ	G	*	*	A	*	A	*	T	*	*	*	A	*	*	*	*
O03	*	G	*	G	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*
Possible Amino Acid Change	Frameshift	No change	P156L	R176G	F216I	No change	No change	G235S	No change	L266M	G268R	G268A	V277M	D291N	No change	R352W	Frameshift

→ **O01 homozygot**

RH FACTOR

- ***RHD* gene (1p36.11)**
- results: *RHD* gene without genetic variations was detected

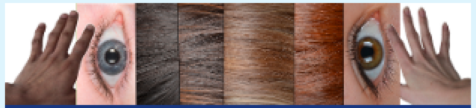
→ **Rh positive**

DNA-based hair and skin colour prediction

- according to HIrisPlex-S Eye, Hair, and Skin Colour DNA Phenotyping Webtool (erasmusmc.nl)
- the assay consists of 24 SNPs: 6 for eye colour prediction
  (not available → low coverage for *HERC2* gene)
  18 used for hair colour and shade prediction

Predicted phenotype	p-value	AUC Loss
blue eye	0	0.293
intermediate eye	0	0.137
brown eye	0	0.297
blond hair	0.331	0.052
brown hair	0.573	0.038
red hair	0.005	0.002
black hair	0.09	0.042
light hair	0.724	0.068
dark hair	0.276	0.068
very pale skin	0.004	0.009
pale skin	0.068	0.024
intermediate skin	0.566	0.025
dark skin	0.118	0.01
dark to black skin	0.244	0.001

The HIrisPlex-S System

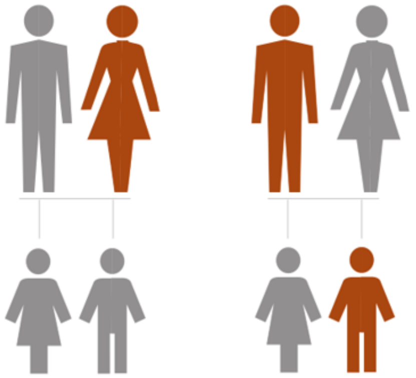


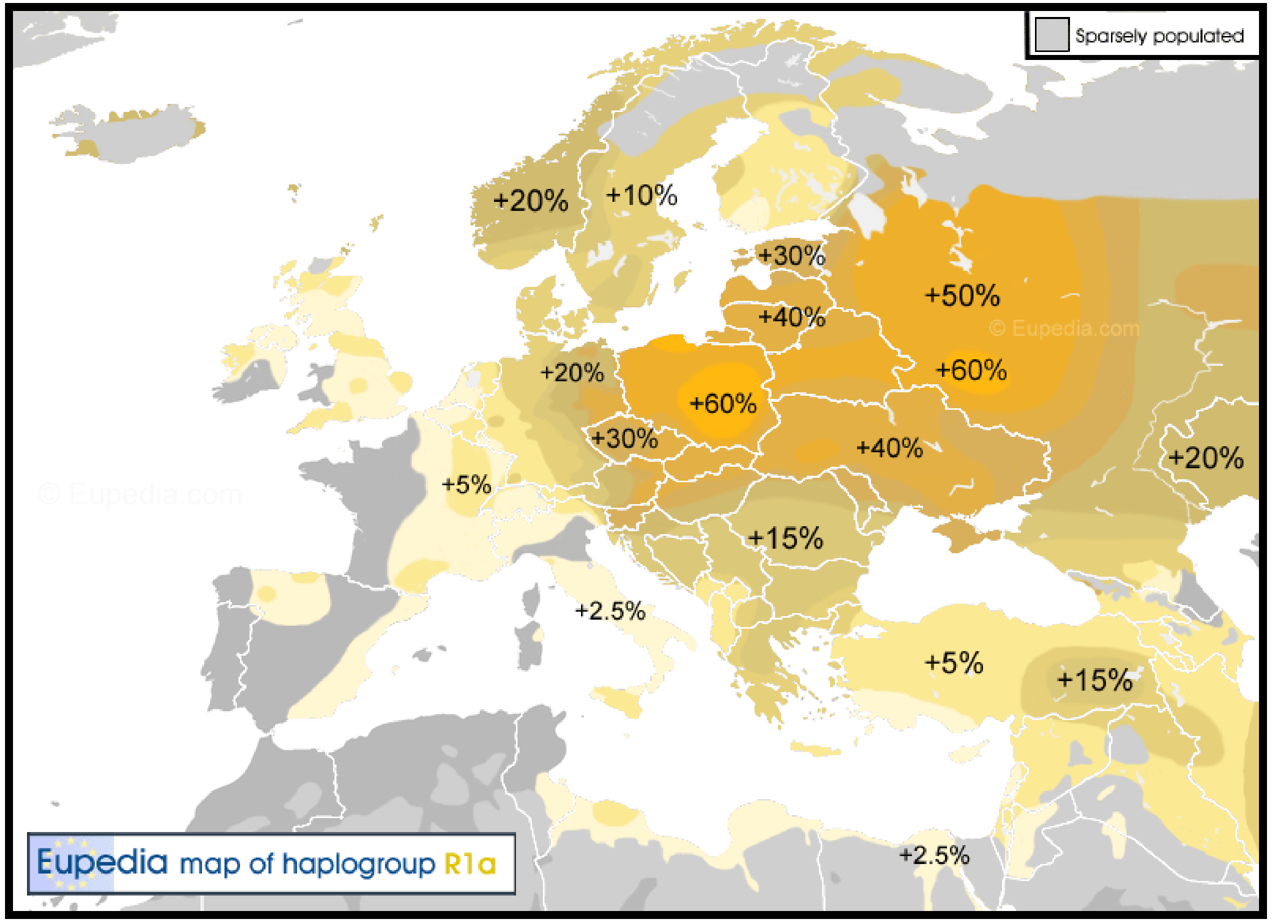
	Gene	SNP	Allele	No. of Alleles
1	*MC1R*	rs312262906	A	**0** 1 2 NA
2	*MC1R*	rs11547464	A	**0** 1 2 NA
3	*MC1R*	rs885479	T	**0** 1 2 NA
4	*MC1R*	rs1805008	T	**0** 1 2 NA
5	*MC1R*	rs1805005	T	0 **1** 2 NA
6	*MC1R*	rs1805006	A	**0** 1 2 NA
7	*MC1R*	rs1805007	T	**0** 1 2 NA
8	*TUBB3*	rs1805009	C	**0** 1 2 NA
9	*MC1R*	rs201326893	A	**0** 1 2 NA
10	*MC1R*	rs2228479	A	**0** 1 2 NA
11	*MC1R*	rs1110400	C	**0** 1 2 NA
12	*SLC45A2*	rs28777	C	**0** 1 2 NA
13	*SLC45A2*	rs16891982	C	**0** 1 2 NA
14	*KITLG*	rs12821256	G	**0** 1 2 NA
15	*LOC105374875*	rs4959270	A	**0** 1 2 NA
16	*IRF4*	rs12203592	T	**0** 1 2 NA
17	*TYR*	rs1042602	T	**0** 1 2 NA
18	*OCA2*	rs1800407	A	**0** 1 2 NA
19	*SLC24A4*	rs2402130	G	0 1 **2** NA
20	*HERC2*	rs12913832	T	0 1 2 **NA**
21	*PIGU*	rs2378249	C	**0** 1 2 NA
22	*LOC105370627*	rs12896399	T	0 **1** 2 NA
23	*TYR*	rs1393350	T	**0** 1 2 NA
24	*TYRP1*	rs683	G	**0** 1 2 NA
25	*ANKRD11*	rs3114908	T	0 **1** 2 NA
26	*OCA2*	rs1800414	C	**0** 1 2 NA
27	*BNC2*	rs10756819	G	0 1 **2** NA
28	*HERC2*	rs2238289	C	0 1 2 **NA**
29	*SLC24A4*	rs17128291	C	**0** 1 2 NA
30	*HERC2*	rs6497292	C	**0** 1 2 NA
31	*HERC2*	rs1129038	G	0 1 2 **NA**
32	*HERC2*	rs1667394	C	0 1 2 **NA**
33	*TYR*	rs1126809	A	**0** 1 2 NA
34	*OCA2*	rs1470608	A	**0** 1 2 NA
35	*SLC24A5*	rs1426654	G	**0** 1 2 NA
36	*ASIP*	rs6119471	C	0 1 **2** NA
37	*OCA2*	rs1545397	T	**0** 1 2 NA
38	*RALY*	rs6059655	T	**0** 1 2 NA
39	*OCA2*	rs12441727	A	**0** 1 2 NA
40	*MC1R*	rs3212355	A	**0** 1 2 NA
41	*DEF8*	rs8051733	C	**0** 1 2 NA

→ hair colour prediction: with probability 57.3% BROWN; 33.1% BLOND
with probability 72.4% LIGHT HAIR

→ skin shade prediction: with probability 56.6% INTERMEDIATE skin (average amount of skin pigment)

Y – haploskupina



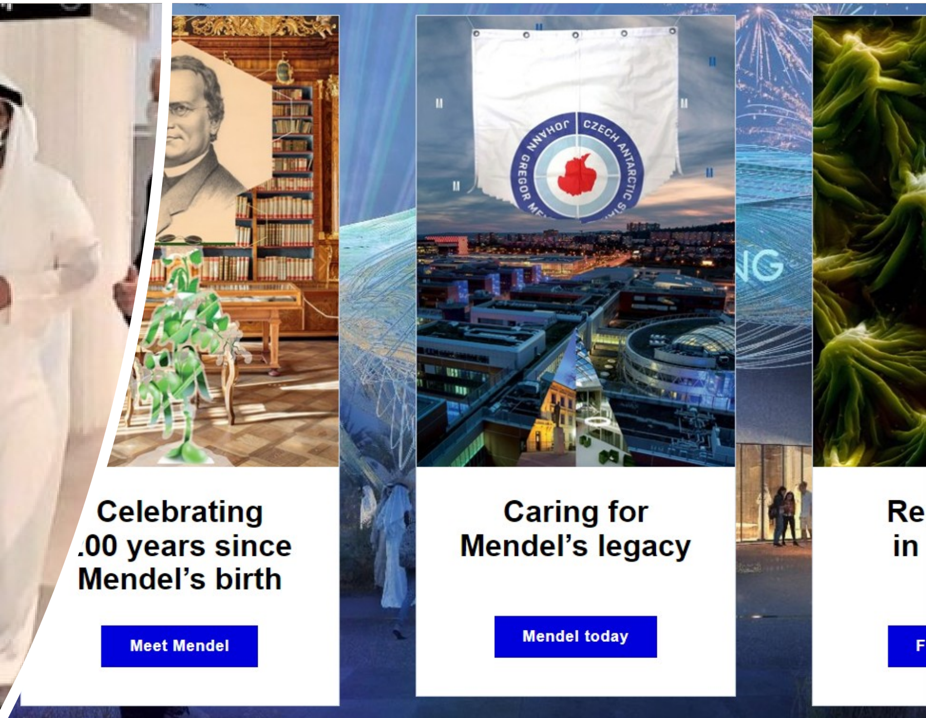


- Determined by variants in the Y chromosome
- Y chromosome is one of two sex determining chromosomes
- Inherited in the paternal lineage
- Mendel's Y-haplogroup: R1a

MUNI

Monument –„peas“ by Jaromir Gargulak

Masaryk University at EXPO 2022 in Dubai



Děkuji za pozornost

CEITEC MU –
Centrum molekulární medicíny

IHOK FN Brno –
Centrum molekulární biologie a genetiky